

**Universidade Federal de Santa Catarina
Curso de Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental**

**MICROCHIP FILOGENÉTICO: UMA NOVA FERRAMENTA
MOLECULAR PARA O ESTUDO DA BIODIVERSIDADE DO
SOLO**

Luana Ronconi

**FLORIANÓPOLIS, (SC)
JULHO/2008**

**Universidade Federal de Santa Catarina
Curso de Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental**

**MICROCHIP FILOGENÉTICO: UMA NOVA FERRAMENTA
MOLECULAR PARA O ESTUDO DA BIODIVERSIDADE DO
SOLO**

Luana Ronconi

**Trabalho apresentado à Universidade
Federal de Santa Catarina para Conclusão
do Curso de Graduação em Engenharia
Sanitária e Ambiental**

**Orientador
Prof. Dr. Henry Xavier Corseuil**

**FLORIANÓPOLIS, (SC)
JULHO/2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL**

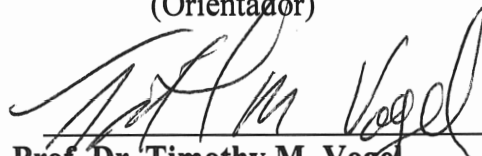
**MICROCHIP FILOGENÉTICO: UMA NOVA FERRAMENTA MOLECULAR
PARA O ESTUDO DA BIODIVERSIDADE DO SOLO**

LUANA RONCONI

**Trabalho submetido à Banca Examinadora como parte dos requisitos para
Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental–
TCC II**

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Henry Xavier Corseuil
(Orientador)



Prof. Dr. Timothy M. Vogel
(Membro da Banca)



Dr. Bénédicte Lafay
(Membro da Banca)

FLORIANÓPOLIS, (SC)

*À minha vó Leide, que me encorajou
a aceitar o desafio e me deu todo o apoio
emocional e financeiro para a realização
desse trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador, professor Henry Corseuil, que confiou em mim e me propôs o desafio de trabalhar com um tema inovador e ainda pouco estudado na engenharia ambiental.

Agradeço aos meus pais, Luciana e Harry, que sempre me apoiaram e me ensinaram o valor dos estudos e do trabalho bem feito.

Obrigada Mura, pelo seu carinho e atenção, pelo seu amor e pelos seus conselhos. Não importa a distância, sei que posso contar com você.

E finalmente, agradeço minhas amigas, Jamile e Yasmine, que souberam ouvir minhas histórias, reclamações e desabafos, e dividiram suas vidas comigo, me fazendo rir e esquecer de todos os problemas.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier M. Timothy Vogel pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser mon stage au sein du Laboratoire Ampère, ce qui a été une expérience unique et qui m'a beaucoup apporté professionnellement et personnellement.

Je remercie aussi Sébastien Cecillon, qui m'a encadré pendant mon stage et m'a appris beaucoup de choses.

Un grand merci à Cédric Malandain qui m'a toujours aidé, qui a répondu à toutes mes nombreuses questions et qui a même lu mon mémoire écrit en portugais.

Finalement, je remercie l'ensemble du laboratoire pour leur accueil et amitié.

RESUMO

Os microrganismos do solo são de fundamental importância para o funcionamento dos ecossistemas e, no entanto, estima-se que apenas 10% deles tenham sido identificados, devido à grande dificuldade das técnicas tradicionais de microbiologia que se baseiam no cultivo dos mesmos. Os microchips filogenéticos, ou microchips de DNA, consistem numa nova ferramenta da biologia molecular que permite a detecção simultânea de várias seqüências de DNA presentes em amostras ambientais. Os microchips são preparados com a utilização de robôs que aplicam amostras de DNA conhecido em diminutos pontos de uma lâmina de vidro. A amostra ambiental que se deseja analisar terá seus ácidos nucleicos extraídos e marcados com um fluoróforo. O ácido nucleico marcado será colocado para hibridizar com o DNA fixado no microchip. A fluorescência remanescente na lâmina após uma lavagem será analisada por um escâner e indicará quais seqüências de DNA estavam presentes no solo, permitindo a identificação dos microrganismos. Este trabalho avaliou a utilização dos microchips filogenéticos na determinação da diversidade microbiológica em solos, destacando a metodologia utilizada para essa aplicação. Constatou-se que as principais etapas consistem na extração do DNA do solo, amplificação do gene 16S por PCR, transcrição e marcação do RNA sintetizado, hibridização e leitura da lâmina. O procedimento metodológico aqui descrito é o empregado no Laboratório Ampère (França) para realização de estudos de diversidade microbiana de solos.

PALAVRAS-CHAVE: microchip filogenético, biodiversidade do solo, diversidade microbiana.

ABSTRACT

Soil microorganisms have fundamental importance for the functioning of ecosystems, and yet it is estimated that only 10% of them have been identified, due to difficulties in the traditional microbiology techniques that are based on cultivation of the microorganisms. Phylogenetic microchips, or DNA microchips, are a new molecular biology tool that enables the detection of many DNA sequences present in environmental samples. These microchips are prepared by robots that deposit known DNA samples in little spots on a glass slide. The nucleic acids from the environmental sample are extracted and labelled with a fluorophore. The labelled nucleic acids are hybridized with the DNA set on the microchip. The fluorescence remaining on the slide after washing is read by a scanner, and it indicates which DNA sequences were present in the soil, allowing the identification of the microorganisms. This study assessed the use of phylogenetic microchips for the determination of microbial diversity in soils, highlighting the methodology used for this application. In summary, the main steps are the extraction of soil DNA, amplification of the 16S gene by PCR, transcription and labeling of RNA, hybridization and slide scanning. The procedure described here is the methodology employed at the Ampère Laboratory (France) to study soil microbial diversity.

KEY-WORDS: phylogenetic microchip, soil biodiversity, microbial diversity.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	4
3.1 Importância dos estudos de biodiversidade do solo	4
3.2 Introdução à biologia molecular	5
3.2.1 DNA	5
3.2.2 RNA	9
3.2.3 Transcrição	11
3.2.4 Gene, genoma e metagenoma	12
3.2.5 Taxonomia e filogenia	13
3.2.6 Gene 16S rDNA	14
3.2.7 PCR	16
3.2.8 Extração do DNA do solo	20
3.3 Estudos de diversidade microbiana dos solos	21
3.3.1 Técnicas tradicionais para estudos de biodiversidade	22
3.3.2 Técnicas moleculares para estudos de biodiversidade	23
3.3.2.1 Técnicas moleculares usuais	24
3.3.2.2 Técnicas moleculares modernas	27
3.3.3 Técnicas tradicionais x técnicas moleculares	28
3.4 Microchips de DNA	29
3.5 Aplicações dos microchips	32
3.5.1 Meio ambiente e saneamento	33
3.5.2 Saúde	35
4. METODOLOGIA	37
4.1 Tipo de pesquisa	37
4.2 Local de trabalho	37
4.3 Universo da pesquisa	38
4.4 Levantamento de dados	39
4.5 Duração do estudo	39

5. RESULTADOS	40
5.1 Extração do DNA da amostra de solo	41
5.2 Quantificação do DNA extraído	44
5.3 Amplificação do gene 16S por PCR	45
5.4 Isolamento do gene 16S por eletroforese	48
5.5 Purificação do gene 16S contido no gel	52
5.6 Transcrição e marcação com Cy3	55
5.7 Purificação do RNA	56
5.8 Fragmentação do RNA	58
5.9 Hibridização	59
5.10 Lavagem	61
5.11 Escaneamento do microchip	63
5.12 Tratamento de dados e resultados	64
 6. CONCLUSÕES	 66
 7. RECOMENDAÇÕES	 68
 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 69
 ANEXOS	 74

1. INTRODUÇÃO

O interesse pelo estudo dos microrganismos presentes no solo é cada vez maior, uma vez que os mesmos têm papel crucial na regulação e funcionamento dos ecossistemas. Além disso, esses microrganismos também podem apresentar valor biotecnológico e econômico, representando uma grande fonte de produtos farmacêuticos, corantes, enzimas, ácidos orgânicos e muitos outros recursos ainda inexplorados. No entanto, apesar de sua importância, o solo tem sido considerado um dos habitats menos estudados do planeta (REIS JUNIOR *et al.*, 2002).

Borneman *et al.* (1996) estimam que entre 80 e 99% dos microrganismos do solo ainda não foram identificados.

As comunidades microbianas do solo estão entre os mais complexos, diversos e importantes grupos de organismos da biosfera; porém, pouco se sabe sobre as espécies que as compõem devido às limitações dos estudos baseados no cultivo dos microrganismos (KUSKE *et al.*, 1997).

Os métodos tradicionais de detecção e identificação de microrganismos limitam bastante a análise da biodiversidade microbiana de um ambiente, uma vez que tomam como base o cultivo de tais microrganismos, sendo o meio de cultivo um seletor de grupos particulares.

De acordo com Reis Junior *et al.* (2002), as limitações dos métodos microbiológicos tradicionais, aliadas ao avanço tecnológico na área de biologia molecular, fazem com que as técnicas moleculares sejam, no momento, muito utilizadas para o estudo da diversidade microbiana do solo.

Os registros de diversidade bacteriana do meio ambiente são muito escassos. Ao final do século XX, buscando inovações nesta área, a ecologia molecular microbiana apresentou grandes avanços devido à utilização de ácidos nucleicos, em especial o DNA, para a detecção e identificação de microrganismos em amostras ambientais. Esta estratégia representa um caminho para estudar os microrganismos não-cultiváveis, auxiliando nos estudos da genômica funcional e possibilitando, futuramente, a obtenção da expressão de genes de microrganismos ainda desconhecidos (SILVEIRA, 2004).

A utilização de ácidos nucleicos aplicada ao estudo de comunidades microbianas se difundiu rapidamente devido a grande quantidade de informação que proporciona e a relativa facilidade metodológica que implicam as análises desses compostos.

Atualmente, milhares de diferentes seqüências de DNA podem ser arranjadas roboticamente em lâminas de vidro de um centímetro quadrado, constituindo assim uma biblioteca genética e permitindo que outras amostras de DNA retiradas do ambiente possam ser confrontadas simultaneamente com as amostras da biblioteca e lidas em minutos com a utilização de um escâner a laser (SEBAT *et al.*, 2003).

Dentre as diversas ferramentas moleculares que surgiram ao longo dos últimos anos, um desenvolvimento tecnológico que veio revolucionar a capacidade de coletar informação na área da genômica é o microchip de DNA, também conhecido como microchip filogenético. Esta tecnologia, baseada na hibridização do DNA, permite

analisar um metagenoma (isto é, o conjunto de vários diferentes genomas associados a um determinado habitat) em apenas um experimento, fornecendo aos pesquisadores informações de milhares de genes simultaneamente (FONSECA, 2005).

De maneira simplificada, o microchip de DNA é uma ferramenta que permite a detecção simultânea de várias seqüências de DNA presentes em amostras ambientais. Consiste numa lâmina de vidro onde são fixados segmentos específicos de DNA de maneira ordenada (sondas). A amostra ambiental (solo, água, etc.) que se deseja examinar terá seus ácidos nucléicos extraídos e marcados com uma molécula fluorescente. Quando o ácido nucléico da amostra é complementar ao segmento de DNA fixado na placa de vidro, ocorre uma ligação entre eles. A fluorescência remanescente na lâmina após uma lavagem será analisada por um escâner e indicará quais seqüências de DNA estavam presentes no solo, sendo possível a identificação dos microrganismos.

O presente Trabalho de Conclusão de Curso consiste na avaliação dessa nova ferramenta molecular, o microchip filogenético, para a determinação da biodiversidade microbiana do solo, detalhando a metodologia a ser utilizada neste tipo de análise. Além disso, será investigado o procedimento adequado para a preparação das amostras ambientais que se deseja analisar e o tratamento estatístico que se deve dar aos resultados obtidos.

A etapa de observação e descrição da metodologia aplicada ao uso de microchips filogenéticos será feita no decorrer de um estágio no Laboratório Ampère da École Centrale de Lyon, na França, onde as pesquisas nesse campo de conhecimento encontram-se bastante desenvolvidas.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Geral*

Avaliar a utilização de microchips filogenéticos na determinação da biodiversidade microbiológica em solos, destacando os procedimentos metodológicos empregados e indicando as melhores condições para aplicação dessa ferramenta.

2.2 *Objetivos Específicos*

- ✓ Pesquisar o uso das ferramentas moleculares no estudo da biodiversidade microbiana de ecossistemas;
- ✓ Realizar estágio no Laboratório Ampère, da École Centrale de Lyon (França), onde são desenvolvidas pesquisas que utilizam microchips filogenéticos;
- ✓ Investigar as formas mais adequadas de preparação das amostras de solo, para que possam ser analisadas pelos microchips filogenéticos;
- ✓ Detalhar o procedimento de análise de biologia molecular pelo uso dos microchips filogenéticos;
- ✓ Apresentar procedimentos estatísticos dos resultados obtidos com o microchip filogenético.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Importância dos estudos de biodiversidade do solo

Os microrganismos presentes no solo desempenham papel importante na ciclagem de nutrientes e na manutenção da fertilidade do solo, características essas que impulsionaram o seu estudo nos dias atuais. Segundo Reis Junior *et al.* (2002), além destas funções, existem ainda microrganismos que são importantes no controle biológico de pragas, na degradação de xenobiontes, na disponibilização de substâncias promotoras de crescimento para as plantas, e no aumento da eficiência dos vegetais na fixação do nitrogênio atmosférico. Os microrganismos podem ainda apresentar valor biotecnológico, constituindo-se numa fonte de novos produtos farmacêuticos, corantes, enzimas e muitos outros produtos ainda desconhecidos.

De acordo com Copley (2000) *apud* Reis Junior *et al.* (2002), apesar de sua importância, o solo tem sido considerado um dos habitats menos estudados do planeta e apenas recentemente começou-se a entender que sua biodiversidade é fator crucial na regulação e no funcionamento dos ecossistemas.

De acordo com Reis Junior *et al.* (2002), a diversidade das bactérias é maior que a de qualquer outro grupo de organismos. Assim, pode-se dizer que o maior celeiro de genes do planeta reside na fração microbiana da biodiversidade. Esta grande diversidade é devida à combinação de dois fatores: genética e ambiente. Segundo Gomes (1998), uma tão grande variedade das características morfológicas, fisiológicas e ecológicas dos diversos grupos de microrganismos é controlada pela constituição genética dos organismos em interação com o ambiente do qual fazem parte. Em outras palavras, a diversidade microbiana cresce como resultado de alterações genéticas (mutações e recombinação genética) que ocorrem para que os microrganismos se adaptem aos vários habitats. O autor explica que os microrganismos mais aptos a crescer, proliferar e competir com os outros de forma vantajosa estabelecem-se nesse novo habitat. Assim, o ambiente constantemente seleciona os indivíduos mais adaptados. A grande variedade físico-química dos habitats existentes na Terra permite a grande diversidade de microrganismos que atualmente se conhece.

De acordo com Borneman *et al.* (1996), a diversidade de microrganismos no solo é essencial para a manutenção da saúde do mesmo, pois estes estão envolvidos em muitas funções importantes tais como a formação do solo, a remoção de toxinas, a participação nos ciclos do carbono, nitrogênio, fósforo e outros. Os autores afirmam, ainda, que o stress ambiental pode alterar as populações microbianas, e que pesticidas e herbicidas podem diminuir a respiração microbiana, sua biomassa e sua diversidade. Para Reis Junior *et al.* (2002), os microrganismos do solo são potencialmente os marcadores biológicos mais sensíveis e disponíveis e podem, portanto, ser muito úteis na classificação de ecossistemas perturbados.

Segundo Turco *et al.* (1994) *apud* Reis Junior *et al.* (2002), várias metodologias são propostas para estudos que envolvem a ecologia microbiana do solo. A diversidade biológica é geralmente utilizada como índice que reflete a qualidade do ecossistema, de modo que as metodologias que possibilitam o estudo da

diversidade microbiana também possam indicar diferenças entre solos tanto com respeito a suas populações quanto a suas funções.

As técnicas utilizadas para estudos de diversidade microbiana podem ser divididas em técnicas tradicionais de microbiologia e técnicas moleculares. Essas duas diferentes abordagens serão descritas no item 3.3. Entretanto, para uma boa compreensão do tema, deve-se primeiramente entender alguns termos, conceitos e técnicas relacionados à biologia molecular, como será tratado a seguir.

3.2 Introdução à biologia molecular

A biologia molecular é o campo da ciência cujo objetivo é a compreensão dos mecanismos de funcionamento da célula em nível molecular, através do estudo das interações bioquímicas celulares envolvidas nos processos de replicação, transcrição e tradução do material genético, estando, dessa maneira, intimamente ligada à genética e à bioquímica (ZAHA, 1996).

Esta ciência tem grande aplicação à microbiologia, colaborando nas áreas de sistemática microbiana com base no genótipo (classificação dos microrganismos), evolução dos microrganismos e algumas aplicações de biotecnologia através da engenharia genética.

Alguns conceitos e técnicas comuns na biologia molecular serão utilizados ao longo desse trabalho. No entanto, tais elementos podem não estar claros para aqueles que não trabalham cotidianamente com essa ciência, fazendo-se necessário uma revisão dos mesmos.

O objetivo desse tópico é fornecer uma explicação sucinta de cada um desses conceitos e técnicas para assegurar a plena compreensão tanto da fundamentação teórica quanto dos resultados do presente trabalho.

Assim, os subitens a seguir apresentarão as informações necessárias sobre o DNA, o RNA, a transcrição, o gene 16S, a taxonomia e a filogenia, a técnica de PCR, bem como as diferenças entre gene, genoma e metagenoma.

3.2.1 DNA

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é uma macromolécula cuja estrutura e propriedades químicas permitem o armazenamento da informação genética necessária para dirigir os processos de síntese de proteínas, o que determinará o desenvolvimento e funcionamento de um organismo. Está presente em todos os organismos celulares e em grande parte dos vírus, sendo responsável pela hereditariedade, uma vez que é transmitido durante os processos de reprodução.

É um polímero quase sempre não ramificado de unidades de desoxirribonucleotídeos. Os desoxirribonucleotídeos são compostos por: um açúcar, a desoxirribose; uma base nitrogenada ligada ao carbono 1' da pentose; e um ou até três grupos fosfato (PO_4^-) ligados ao carbono 5' da pentose (ZAHA, 1996). A Figura 1 ilustra um desoxirribonucleotídeo.

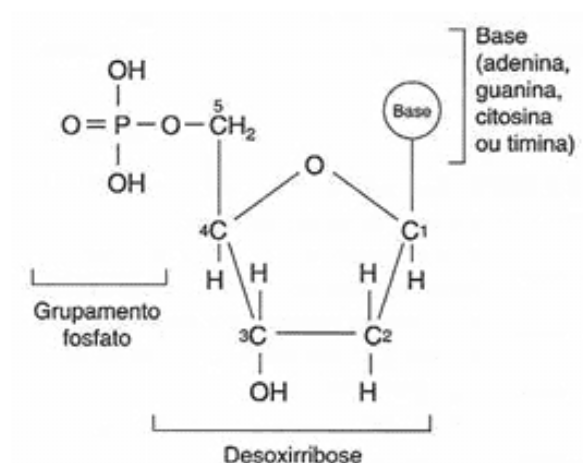


Figura 1 – Esquema de um desoxirribonucleotídeo.

As bases nitrogenadas que podem estar presentes nos desoxirribonucleotídeos são: adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T). As duas primeiras são ditas purinas (formadas por dois anéis aromáticos) e as duas últimas pirimidinas (formadas por um único anel aromático). A Figura 2 apresenta a estrutura química das bases nitrogenadas.

Base	Adenina (A)	Guanina (G)	Timina (T)	Citosina (C)
Purina/ Pirimidina	Purina	Purina	Pirimidina	Pirimidina
Estrutura Química				
Representação Simplificada				

Figura 2 – Estrutura química e representação simplificada das bases nitrogenadas presentes numa molécula de DNA.

Graças à sucessão das quatro bases nitrogenadas, as seqüências dos nucleotídeos na molécula de DNA constituem uma mensagem codificada, portando as informações genéticas. De fato, a ordem, a natureza e o número de nucleotídeos determinam tal informação.

Na molécula de DNA, os desoxirribonucleotídeos formam cadeias ligadas entre si por pontes fosfodiéster estabelecidas entre o grupo fosfato do carbono 5' e o grupo hidroxila do carbono 3' do nucleotídeo adjacente, como mostrado na Figura 3. Essa ligação é chamada de 5'-3' fosfodiéster (ZAHA, 1996).

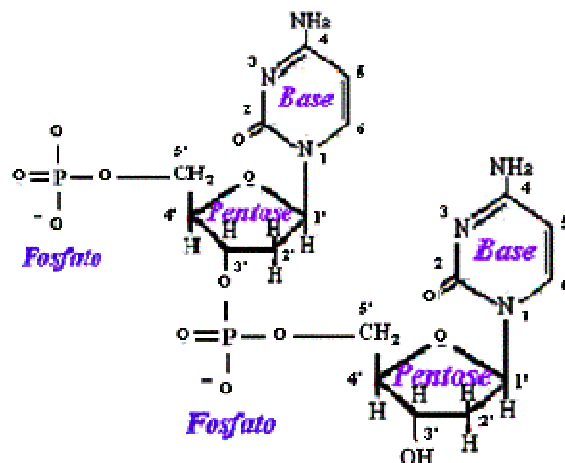


Figura 3 – Ligação fosfodiéster entre desoxirribonucleotídeos.

Em 1953, James Watson e Francis Crick propuseram um modelo de estrutura tridimensional do DNA. Este modelo mostrou que o DNA é uma dupla-hélice e que as duas fitas de DNA se enrolam em torno do eixo da hélice. As desoxirriboses ficam externas em relação às bases nitrogenadas, como se fossem os corrimãos de uma escada circular, expostas ao meio aquoso. Os anéis aromáticos das bases nitrogenadas são hidrofóbicos e ficam orientados para o interior, quase perpendiculares ao eixo da hélice. As bases estão pareadas entre as duas fitas da molécula, mantendo a sua estrutura, como ilustra a Figura 4. Isso é possível porque os nucleotídeos encontrados em uma fita de DNA possuem nucleotídeos complementares com os quais podem interagir através de pontes de hidrogênio (ZAHA, 1996).

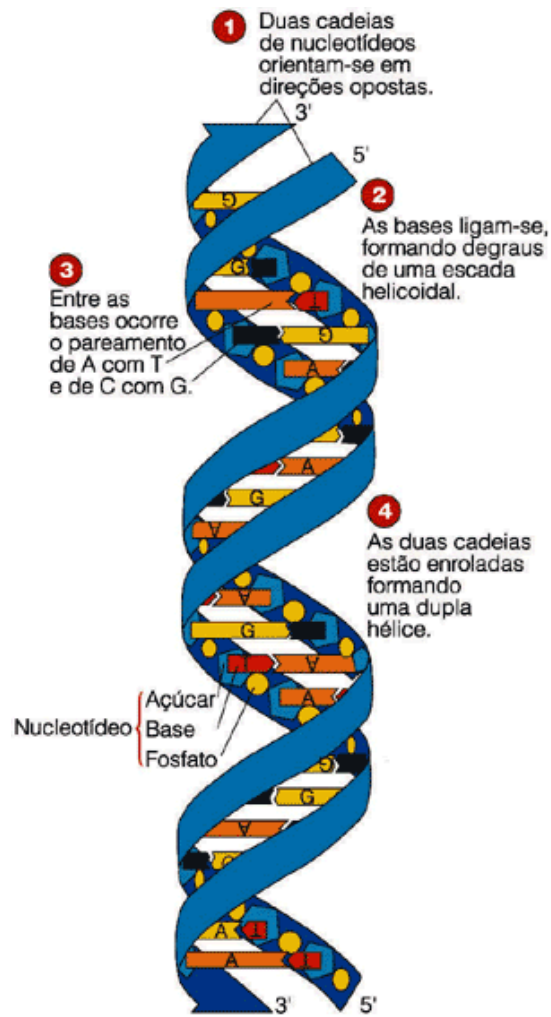


Figura 4 – Estrutura de dupla hélice do DNA.

O pareamento das bases é fundamental para a manutenção da dupla-hélice. Duas características das bases nitrogenadas são importantes: sua estrutura química e seu tamanho. A presença de grupos ceto e amino permite a formação de pontes de hidrogênio entre as bases. Dessa forma, a timina (T), que contém grupos ceto, pode parar com a adenina (A), que contém grupos amino, através de duas pontes de hidrogênio. A citosina (C) e a guanina (G), que contém tanto grupos ceto quanto grupos amino, podem formar três pontes de hidrogênio (ZAHA, 1996). A Figura 5 esquematiza as ligações entre bases complementares.

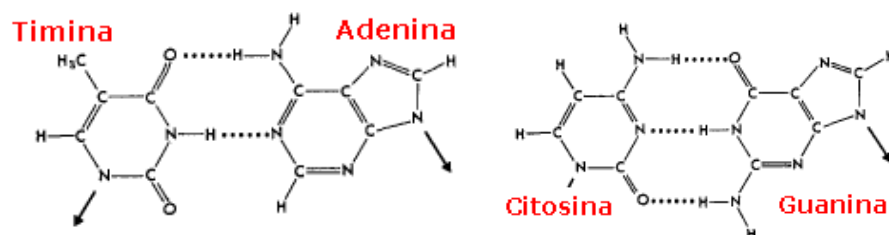


Figura 5 – Pontes de hidrogênio timina-adenina (T=A) e citosina-guanina (C=G).

Segundo Zaha (1996), os pares AT e CG têm aproximadamente o mesmo tamanho e dimensões semelhantes, o que faz com que ocupem o mesmo espaço, permitindo uma dimensão uniforme ao longo da molécula de DNA. Essas características de pareamento explicam o fato de que, em qualquer sequência de DNA, a relação molar entre A/T seja igual a 1, o mesmo ocorrendo com a relação C/G, embora as concentrações molares entre AT e CG variem com a sequência de DNA analisada. Essa característica de pareamento tem grande importância fisiológica, e devido a ela, as duas fitas de DNA são ditas complementares.

3.2.2 RNA

O ácido ribonucléico (RNA) é uma molécula intermediária na síntese de proteínas, fazendo a intermediação entre o DNA e as proteínas. Uma das funções do RNA numa célula é o suporte temporário da informação genética. Assim, o RNA é utilizado pela célula para transmitir a informação correspondente a um determinado gene ao exterior do núcleo, permitindo a síntese de proteínas a partir dessas informações. Além disso, o ácido ribonucléico pode agir como um catalisador enzimático, pois do mesmo modo que as proteínas, o RNA pode “se dobrar” para formar estruturas complexas. Essas estruturas permitem certos RNA de se comportarem como enzimas (ribozimas).

A estrutura do RNA é semelhante à do DNA, constituindo-se em um polímero de unidades de ribonucleotídeos. Os ribonucleotídeos são formados por uma ribose (açúcar), por um grupo fosfato e uma base nitrogenada que pode ser adenina (A), guanina (G), citosina (C) e uracila (U), como representado na Figura 6 (ZAHA, 1996).

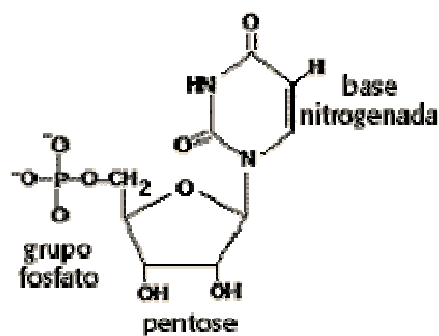


Figura 6 – Esquema de um ribonucleotídeo.

Do ponto de vista estrutural, são quatro as principais diferenças entre o RNA e o DNA:

- a desoxirribose é substituída pela ribose;
- a base nitrogenada timina é substituída pela uracila (U);
- o RNA é geralmente uma fita simples;
- a cadeia do RNA é mais curta do que a do DNA (de 50 a 5000 nucleotídeos, enquanto a do DNA pode chegar a milhões).

Os ribonucleotídeos são ligados entre si através de uma ligação fosfodiéster entre o carbono 3' de um nucleotídeo e o carbono 5' do nucleotídeo adjacente, como ilustra a Figura 7.

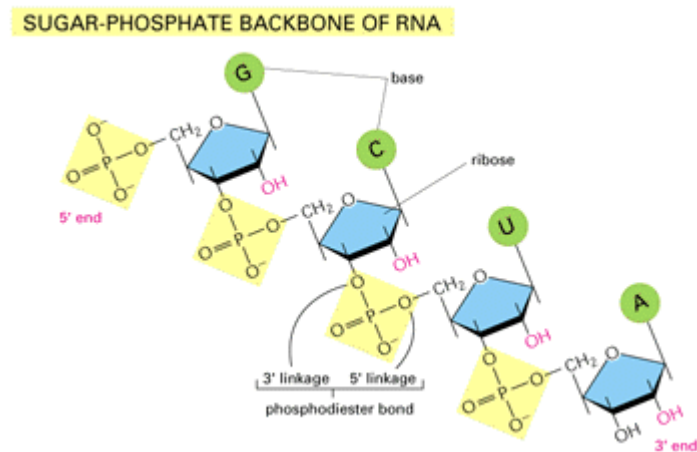


Figura 7 – Ligação fosfodiéster entre os ribonucleotídeos.

Por ser uma fita simples, o RNA pode formar pontes intracadeia (Figura 8), o que faz com que ele possa ter uma infinidade de arranjos tridimensionais, importantes para sua função. Em outras palavras, a fita simples de RNA pode se dobrar sobre ela mesma, formando uma estrutura intramolecular que pode ser muito estável e compacta. A base dessa estrutura é a formação de pareamentos internos entre bases complementares (adenina com uracila e guanina com citosina).

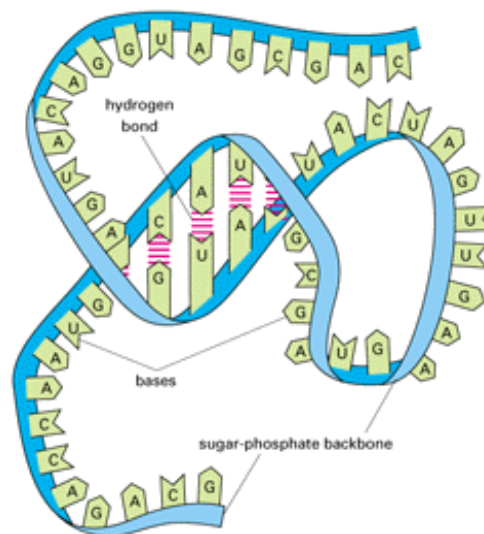


Figura 8 – Pontes intracadeia: pareamentos internos de bases complementares numa fita de RNA.

Do ponto de vista evolutivo, acredita-se que o RNA é anterior ao DNA como suporte da informação genética, o que explicaria suas funções mais numerosas e sua generalização. O DNA teria aparecido mais tarde e só substituiu o RNA na função de armazenamento em longo prazo, devido a sua maior estabilidade.

Essa estabilidade é devida ao desaparecimento de um grupo hidroxila (OH, oxi) do carbono 2' da ribose (a própria nomenclatura “desoxirribose” indica a perda de um grupo oxi da ribose). Além disso, a estabilidade temporal da informação genética também está ligada ao fato do DNA ser uma dupla-fita: se uma mutação ocorre numa das fitas de DNA, a célula pode corrigir esse erro baseando-se na complementaridade das fitas.

A diferença entre as bases nitrogenadas do DNA e RNA também influencia na estabilidade das moléculas. A uracila é mais fácil de ser produzida pelos seres vivos do que a timina (menos onerosa, em termos de energia gasta), mas se converte lentamente em citosina. Por essa razão, o RNA contém uracila e o DNA timina: a célula produz muito RNA, mas não precisa conservá-lo por muito tempo, e então, é o “custo da produção” que prevalece sobre a estabilidade das informações. Inversamente, o DNA deve conservar as informações por longos períodos de tempo, mas não é produzido constantemente (apenas durante a divisão celular) e, portanto, é a estabilidade que prevalece sobre o custo.

3.2.3 Transcrição

A transcrição é o processo pelo qual uma molécula de RNA é sintetizada a partir da informação contida na sequência de nucleotídeos de uma molécula de DNA.

As RNA polimerases são enzimas, geralmente formadas por muitas cadeias polipeptídicas, que catalisam o processo de transcrição do DNA. Em procariotos existe apenas um tipo de RNA polimerase enquanto nos eucariontes existem três.

A transcrição ocorre em três etapas principais: a iniciação, o alongamento e o término, cada uma contendo fatores específicos.

A síntese de RNA começa em regiões do DNA chamadas de promotoras (sequências específicas reconhecidas pela RNA polimerase) que direcionam a transcrição de genes. Uma importante etapa na iniciação da transcrição é a abertura da dupla fita de DNA, que é feita através do rompimento das pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas complementares dessa molécula.

Na fase de alongamento, uma das fitas do DNA é utilizada com molde para a construção do RNA, e os nucleotídeos livres na célula vão se pareando a esse segmento aberto, através da ligação entre as bases nitrogenadas de RNA (A, C, G, U) a essa fita de DNA. Durante essa fase, o RNA recém-sintetizado parecia-se temporariamente com a fita molde de DNA, formando um híbrido curto RNA-DNA.

Uma vez iniciada, a transcrição segue numa velocidade de aproximadamente 50 nucleotídeos por segundo, estando a RNA polimerase ligada à fita molde de DNA até encontrar o sinal de término da transcrição.

O final da transcrição é um processo bem controlado no qual sequências típicas dos transcritos de RNA (sinais de término) indicam o local para a finalização da

síntese dessa molécula. O processo é concluído quando o filamento de RNA formado se destaca e as duas fitas de DNA voltam a se unir.

A Figura 9 esquematiza o processo de transcrição de uma molécula de DNA.

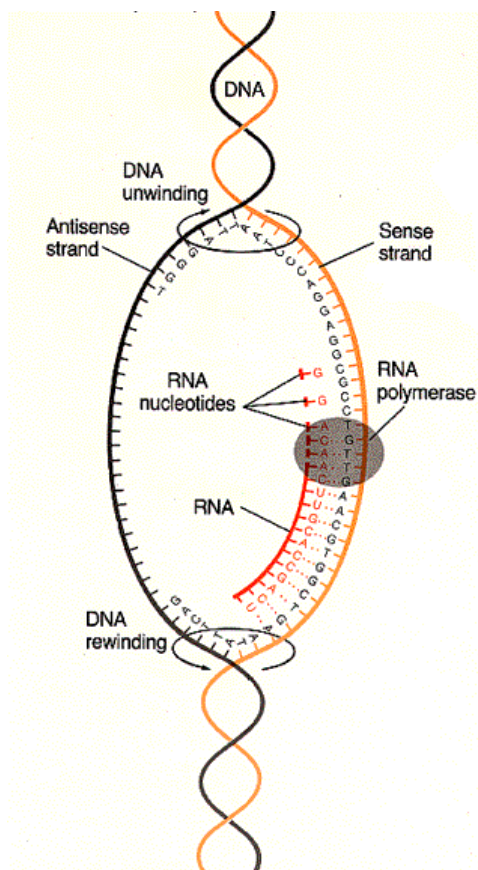


Figura 9 – Transcrição do DNA: síntese do RNA.

3.2.4 Gene, genoma e metagenoma

A informação genética contida na sequência de bases do DNA direciona a produção das proteínas e enzimas que constroem a célula. Os ácidos nucleicos estão organizados em unidades chamadas de genes, e o conjunto de todos os genes constitui o genoma (REECE, 2003).

Segundo Zaha (1996), os genes são sequências de DNA, com número definido de nucleotídeos seguindo uma determinada ordem, responsáveis pelas características fenotípicas de um indivíduo. De fato, os genes governam a síntese do RNA, que é traduzido para formação de proteínas, diretamente ou indiretamente responsáveis por todas as características do organismo. Também pode ser considerado como a região da sequência genética que está ligada a hereditariedade.

De acordo com Fonseca (2005), a atitude reducionista de analisar os genes um a um, dominante durante as últimas décadas do século XX, deu lugar a uma abordagem muito mais abrangente. O objetivo atual é conhecer o conjunto de todos

os genes de um organismo, denominado genoma, e compreender as redes funcionais que se estabelecem entre as proteínas por eles codificadas (isto é, o proteoma).

Genoma é, portanto, o conjunto de todos os genes de um determinado organismo. Um genoma contém tanto as seqüências codificantes (que serão transcritas em RNA e traduzidas em proteínas), quanto não-codificantes (que tem função regulatória da expressão de outros genes).

O genoma possui a função básica de servir como um repositório da informação codificada pelo DNA que o constitui. Assim, sob esse aspecto, qualquer genoma bacteriano é similar, por exemplo, ao genoma humano. Genoma de procariotos, contudo, são relativamente mais simples que genomas de eucariotos, por apresentarem uma estrutura mais compacta e dedicada, quase que exclusivamente, à codificação de proteínas. Praticamente todo o DNA desses organismos tem função codificante (genes estruturais) ou regulatória. Entretanto, não há uma relação clara entre o tamanho do genoma e a complexidade nos organismos eucarióticos (ZAHA, 1996).

As estimativas mais conservadoras acerca da complexidade genética de comunidades microbianas do solo indicam a presença de 6.000 a 10.000 genomas diferentes em solos orgânicos não perturbados e um número menor, entre 350 e 1.500, em solos agrícolas contaminados com metais pesados (TORSVIK *et al.*, 1998, *apud* NOGALES, 2005).

O conjunto dos genomas de populações microbianas de um determinado ambiente é chamado de metagenoma. O método utilizado para analisar tal conjunto, a metagenômica, consiste em estudar coletivamente os genes, sem detalhá-los indivíduo por indivíduo. Esse tipo de estudo já foi realizado com êxito em comunidades microbianas de solo (RONDON *et al.*, 2000).

Segundo Silveira (2004), a construção de bibliotecas metagenômicas permitiu um grande avanço nos estudos da biodiversidade, tornando-se uma poderosa abordagem para explorar a diversidade microbiana do solo e fornecendo inclusive dados sobre os microrganismos não cultiváveis desse habitat.

As possibilidades que geram a metagenômica e as demais técnicas moleculares são múltiplas, e assim pode-se esperar importantes avanços no conhecimento do funcionamento das comunidades microbianas do solo.

3.2.5 Taxonomia e filogenia

Sendo a biodiversidade do planeta extremamente rica, desde cedo, a humanidade sentiu necessidade de organizar, ordenar e nomear os organismos vivos. À ciência que é responsável pela descrição, identificação e classificação dos seres vivos dá-se o nome de taxonomia.

Inicialmente a classificação era feita exclusivamente através das características morfológicas dos organismos. Passado algum tempo, novos sistemas de classificação foram propostos e estes envolviam a filogenia, ou seja, a história evolutiva da espécie.

Os sistemas de classificação em que o agrupamento dos organismos é baseado na similaridade dos seus indivíduos, incluindo características fenotípicas e genotípicas, sem referência a conceitos de ancestralidade denominam-se fenéticos.

Contrariamente aos sistemas de classificação fenética, na classificação filogenética os organismos são agrupados de acordo com a sua antiguidade. Deste modo, em filogenia não é considerada a similaridade atual entre os indivíduos (GOMES, 1998).

Durante a primeira metade do século XX, a classificação filogenética dos organismos multicelulares teve um grande desenvolvimento. No entanto, a simplicidade morfológica dos microrganismos procarióticos não permitia a ocorrência de um registro fóssil fiável para estudos de filogenia, o que desencorajou a criação de sistemas de classificação baseados nas relações de ancestralidade dos organismos. Os primeiros sistemas de identificação e comparação dos microrganismos baseavam-se num pequeno número de características, principalmente morfológicas e fisiológicas, escolhidas subjetivamente pelo taxonomista. Deste modo, tais sistemas de classificação resultavam, normalmente, no agrupamento de organismos que não possuíam verdadeiras afinidades (GOMES, 1998).

De acordo com Thompson e Oliveira (2006), nos últimos 40 anos, com o desenvolvimento nas áreas de química, biologia molecular, estatística e informática, a taxonomia dos microrganismos sofreu profundas alterações na direção de um sistema que refletisse as relações evolutivas entre os organismos aproximando a classificação microbiana o melhor possível da realidade biológica.

Com o desenvolvimento das técnicas de seqüenciamento de proteínas e de ácidos nucleicos (DNA e RNA) e a sua aplicação à sistemática microbiana pôde-se esclarecer as relações filogenéticas dos organismos procarióticos. Estudos iniciados por Woese (1987) baseiam-se, principalmente, na comparação de zonas conservativas do gene de 16S rDNA. Recentemente, várias macromoléculas, ou os genes que as codificam, têm sido utilizadas para esclarecer as relações de ancestralidade dos organismos (GOMES, 1998).

Desta maneira, a biologia molecular e as ferramentas moleculares, especialmente aquelas baseadas na codificação do gene 16S rDNA, podem contribuir enormemente à taxonomia dos microrganismos.

3.2.6 Gene 16S rDNA

Dentre as macromoléculas utilizadas nas análises filogenéticas, os ácidos ribonucleicos ribossomais (rRNA) são considerados os biopolímeros mais adequados para estudos de diversidade e para o estabelecimento de relações de ancestralidade entre microrganismos. Seus genes, os rDNAs, são universalmente distribuídos entre os diferentes grupos de seres vivos, sendo a molécula com maior grau de conservação existente (LANE *et al.*, 1985).

Ribossomos são organelas que participam ativamente da síntese de proteínas e são compostos de agregações muito complexas de proteínas e RNA ribossômico. São

constituídos por duas subunidades de tamanhos desiguais, a maior e a menor, que estão intimamente ligadas.

O gene *rrs*, mais conhecido como 16S rDNA, codifica para a subunidade ribossômica menor (parte do sítio onde ocorre a síntese protéica) e está presente em todas as bactérias. É formado por cerca de 1.500 nucleotídeos e gera grande quantidade de informações úteis para inferências filogenéticas. Apesar de o 23S rRNA (cerca de 3.000 nucleotídeos) conter duas vezes mais informação e, portanto, gerar maior acurácia nas inferências filogenéticas, a molécula do 16S rRNA, por causa da maior facilidade de sequenciamento, tornou-se referência (REIS JUNIOR *et al.*, 2002).

De acordo com Silveira (2004), diferenças de diversidade de microrganismos podem ser avaliadas através da região 16S do RNA ribossômico (16S rRNA) que é conservativa no genoma bacteriano, diminuindo as dificuldades das técnicas de cultivo e melhorando o entendimento dos microrganismos. Ainda segundo o autor, o estudo do 16S rRNA revolucionou o campo da ecologia microbiana e, com seu uso, é possível investigar posições filogenéticas de comunidades bacterianas de meio ambiente.

Os estudos com o gene rDNA foram iniciados por Carl Woese (1987) que demonstrou que esta molécula se constituía num excelente marcador molecular. De acordo com Woese (1987), o 16S rRNA é extremamente útil na afiliação filogenética de bactérias em espécies, gêneros e famílias.

As primeiras aplicações de técnicas baseadas em ácidos nucleicos no estudo de ecologia microbiana foram concernentes a relações filogenéticas entre microrganismos determinada pela análise da sequência do 16S rRNA. Como resultados de tais estudos sabe-se hoje que a diversidade microbiana do solo é enorme. O desafio dos estudiosos da microbiologia do solo é agora identificar as populações de microrganismos que tem papel-chave no funcionamento de determinados processos característicos desse ambiente (MACRAE, 2000).

Segundo Gomes (1998), a sequência do genoma bacteriano é o termo de comparação por excelência, mas na impossibilidade da sua completa determinação, tem sido válida a análise sistemática da sequência da subunidade 16S rRNA, pois permite proceder à elaboração de árvores filogenéticas onde se podem colocar vários grupos evolutivos de bactérias próximos e observar as suas relações de ancestralidade. Quando a sequência do gene de 16S rDNA de várias estirpes apresenta valores superiores a 95% são considerados como membros da mesma espécie.

A utilização da sequência do 16S possui vantagens em relação ao sequenciamento do genoma completo, tais como:

- a) redução do tempo de análise;
- b) diminuição do custo do trabalho;
- c) estão presente em todos os organismos e têm a mesma função em todos eles;
- d) sua transmissão é principalmente vertical já que se considera que não está sujeito a transferência gênica horizontal entre microorganismos;

e) o comprimento de sua sequência tem tamanho adequado para fornecer informação suficiente, com um custo viável;

f) a análise da sequência permite realizar reconstruções filogenéticas dos microrganismos.

Outra vantagem de se usar informações sobre as sequências do rRNA é a sua disponibilização em bases dados, na maioria dos casos acessíveis gratuitamente, permitindo a comparação de novas sequências obtidas com as sequências presentes nessas bases (COUTINHO *et al.*, 1999, *apud* REIS JUNIOR *et al.*, 2002).

As análises moleculares baseadas na utilização de genes ribossômicos evidenciaram alguns grupos microbianos presentes no solo que já haviam sido descritos em outros ambientes, mas cuja presença no solo sequer se suspeitava. Exemplos destes grupos são os *Planctomycetes*, que haviam sido descritos exclusivamente em ambientes aquáticos e os microrganismos do domínio *Archaea*, que apenas haviam sido descritos em ambientes extremos ou nichos ecológicos particulares (termófilos, halófilos extremos, ambientes sulfurosos e metanógenos) (NOGALES, 2005).

Outra descoberta que a utilização de técnicas baseadas no sequenciamento do 16S rRNA aportou para a microbiologia foi o descobrimento de novos grupos bacterianos, desconhecidos até o momento porque careciam de cultivos.

Em seu trabalho, Nogales (2005) cita alguns estudos que vem recebendo particular atenção da microbiologia molecular, trazendo os autores que trabalharam com cada tema. Assim, segundo o autor, recebem destaque os estudos da microbiota em solos contaminados com metais pesados (Sandaa *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 2001) ou com contaminantes orgânicos como os hidrocarbonetos do petróleo (Juck *et al.*, 2000; Andreoni *et al.*, 2004), além do estudo das mudanças que ocorrem na microbiota durante os processos de biorremediação (Ka *et al.*, 2001; Siciliano *et al.*, 2003).

3.2.7 PCR

A Reação em Cadeia da Polimerase, em inglês *Polymerase Chain Reaction* (PCR), é uma técnica muito utilizada nas mais diversas aplicações da biologia molecular. A maioria das técnicas moleculares existentes atualmente utiliza a PCR, sendo esta uma técnica com aplicação nos mais diversos tipos de estudos, dentre eles os de diversidade microbiana do solo.

O desenvolvimento da PCR trouxe grande impulso para os métodos moleculares. Esta técnica foi concebida por Kary Mullis em meados da década de 80 e desde sua concepção causou uma verdadeira revolução nas pesquisas. O impacto da PCR e seus métodos derivados deram a Mullis o prêmio Nobel em 1993 (LUCIANO, 2004).

A função da PCR é a de amplificar pequenos e específicos segmentos do genoma, permitindo a obtenção *in vitro* de várias cópias de determinada região do DNA, na presença da enzima DNA polimerase (REIS JUNIOR *et al.*, 2002).

A técnica transformou profundamente as práticas da biologia molecular através da vasta extensão da capacidade de identificar e manipular o material genético. A PCR facilita a identificação de segmentos de DNA precisos e reproduz acuradamente milhões de cópias do dado segmento num curto período de tempo. Esta técnica tornou abundante o que era antes escasso: o material genético requerido para experimentações. Além de ser abundante, este material não está mais embebido dentro de um sistema biológico vivo (RABINOW, 1997).

De acordo com Rabinow (1997), apesar da técnica de clonagem ter proporcionado abundância de material genético, sua obrigatoriedade no uso de organismos vivos como meio de reprodução representava uma limitação; a PCR deu um grande passo, afastando-se dessa dependência. Esse passo permitiu um grande avanço na eficiência e, ainda mais importante, na flexibilidade das intervenções genéticas.

A reação de PCR é específica, e assim, pode-se obter a amplificação de seqüências de nucleotídeos-alvo mesmo em uma amostra com grande diversidade de seqüências, permitindo a detecção de organismos específicos em misturas heterogêneas.

A condição básica para a aplicação da técnica, depende da construção de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) os quais são complementares as duas fitas opostas do DNA e que estejam flanqueando a seqüência a ser amplificada (LUCIANO, 2004).

Reis Junior *et al.* (2002) explicam que seqüências do DNA de determinados microrganismos podem ser amplificadas, utilizando-se *primers* complementares àquelas localizadas em locais específicos do genoma. O que ocorre é a extensão do fragmento de DNA a partir dos *primers*, pela ação de uma DNA polimerase termoestável, a Taq DNA polimerase. A Taq polimerase foi originalmente isolada do microrganismo *Thermus aquaticus*, que vive em fontes de águas à temperatura de 75°C encontrada no Yellowstone National Park.

A polimerase é uma enzima natural, uma macromolécula que catalisa a formação e o reparo do DNA. A replicação precisa de toda matéria viva depende de sua atividade, atividade essa que os cientistas aprenderam a manipular. Nos anos 80, Kary Mullis trabalhando na Cetus Corporation, primeira companhia de DNA recombinante, fundada em 1971, concebeu uma maneira de iniciar e parar a ação da polimerase em pontos específicos da fita simples de DNA (RABINOW, 1997).

Para a realização de uma PCR alguns componentes básicos são necessários:

a) *Primers*: pequenas seqüências de DNA, geralmente com 18-20 bases que hibridizam com o gene de interesse.

b) DNA molde: cromossomo ou fragmento de DNA que possua o gene de interesse. O ideal é que o ácido nucléico esteja livre de impurezas (proteínas, lipídeos, outro ácido nucléico, reagentes de extração, etc.) e numa concentração mínima de 5µg/mL.

c) DNA polimerase: enzima que é capaz de sintetizar novas fitas de DNA a partir de fitas simples do DNA (ou RNA) molde. A mais utilizada ainda é a Taq polimerase, por ser termoestável.

d) Desoxirribonucleotídeos: matéria-prima propriamente dita para a síntese das fitas-filhas. São compostos por nucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) desoxilados no carbono 5' da desoxirribose. São adicionados pela polimerase complementarmente à fita-mãe. Adiciona-se uma mistura de todos os dNTP's em concentrações iguais à reação.

e) Solução-tampão: soluções que contêm íons diversos (Na^+ , Cl^- , K^+ , entre outros) que otimizam as condições de reação. Normalmente, a maioria das DNA polimerases disponíveis no mercado são fornecidas conjuntamente com uma solução-tampão específica, cuja composição varia de acordo com o fabricante.

Antes da extensão, o DNA é desnaturado e o *primer* anelado, sendo o ciclo “desnaturação – anelamento – extensão” repetido várias vezes, permitindo a amplificação exponencial daquela sequência específica, uma vez que os produtos obtidos no final de cada ciclo servem como matriz para o ciclo seguinte (REIS JUNIOR *et al.*, 2002).

Assim, a quantidade de DNA final segue uma função exponencial, onde:

$$N = N_0 \times 2^n$$

N = Número final de cadeias de DNA;

N_0 = Número inicial de DNA molde;

n = Número de repetições do ciclo.

Portanto, a concentração final do DNA molde na solução é muito maior (da ordem de 2^{35}) do que a inicial.

Luciano (2004) explica de maneira simplificada cada passo desse ciclo:

a) O processo inicia-se com a desnaturação da dupla fita do DNA que contém a sequência a ser amplificada. Geralmente, a desnaturação é realizada a uma temperatura de 94°C durante 5 minutos, pois nessas condições as duas fitas do DNA se separam.

b) O passo seguinte consiste em baixar a temperatura de acordo com o *primer* específico, permitindo que os oligonucleotídeos iniciadores anelem-se especificamente nas extremidades flanqueadas da sequência alvo e nas fitas opostas.

c) Finalmente, a temperatura é elevada para aproximadamente 72°C e nesta temperatura há incorporação de 35 a 100 nucleotídeos por segundo, fazendo com que a polimerase copie a sequência alvo a partir dos oligonucleotídeos iniciadores.

A Figura 10 ilustra as etapas do ciclo da técnica de PCR.

Reação em Cadeia da Polimerase

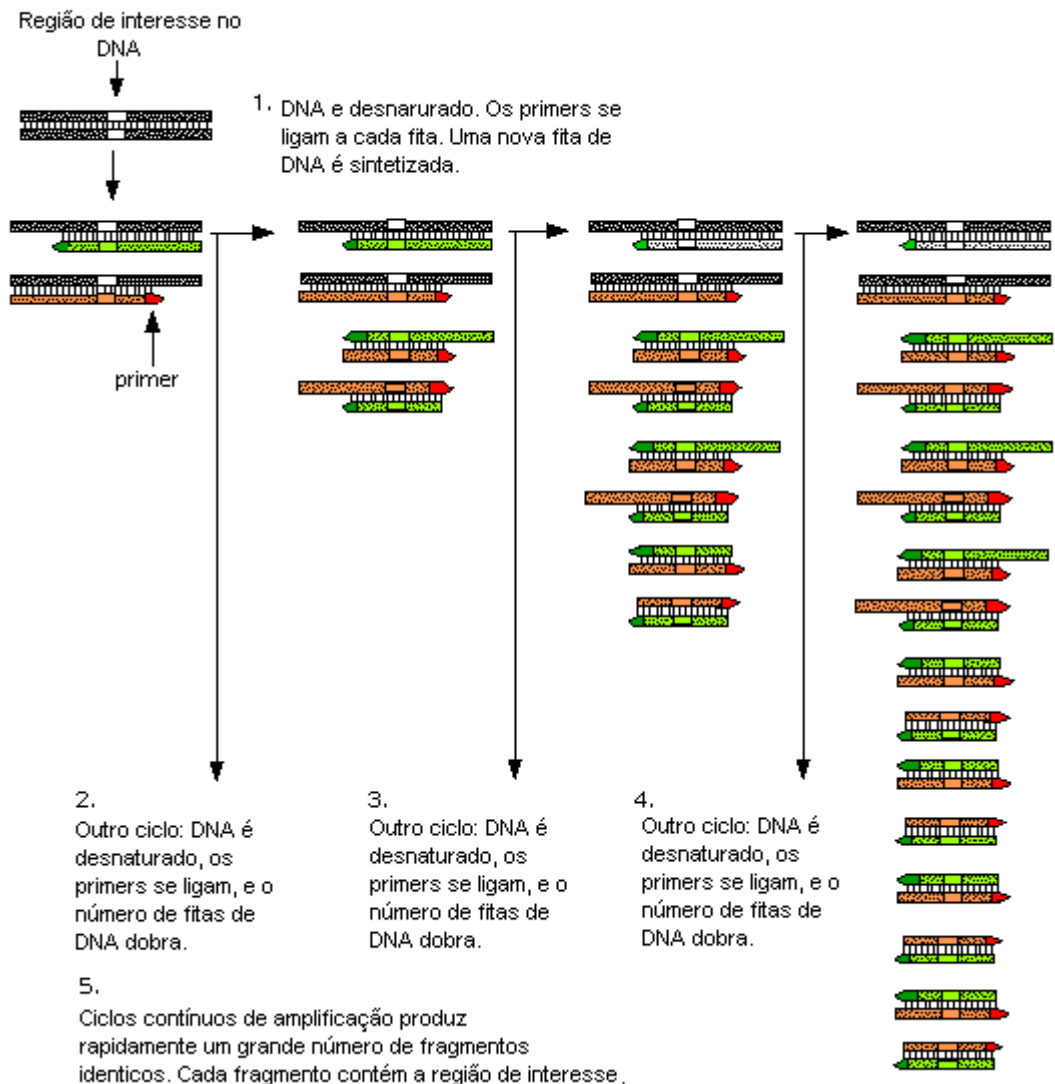


Figura 10 – Representação esquemática da técnica de PCR.

A realização dos ciclos de temperatura é feita por um aparelho denominado termociclador (Figura 11). O primeiro termociclador automático foi criado em 1989 e até hoje a maioria dos termocicladores funciona com o mesmo princípio: aquecimento por resistências elétricas e refrigeração com ventoinhas e tubulações em serpentina preenchidas por etileno glicol. Aperfeiçoou-se os sistemas de contagem de tempo, para aumentar a confiabilidade das reações. Em meados dos anos 90 surge o padrão Peltier, cujo bloco de aquecimento é composto por uma liga metálica que aquece ou resfria de acordo com o sentido da corrente elétrica aplicada.



Figura 11 – Termociclador atual.

A detecção de organismos específicos em extratos de plantas ou de solo pode ser determinada utilizando-se a técnica da PCR. Neste tipo de estudo, os *primers* específicos são usados em uma PCR com o DNA extraído dos extratos como molde. A detecção de determinado organismo é indicada pela formação de um produto de amplificação de tamanho definido (REIS JUNIOR *et al.*, 2002).

Os métodos baseados nas reações de PCR dependem da pureza das amostras uma vez que a PCR é inibida por contaminantes como os ácidos húmicos (TEBBE & VAHJEN, 1993).

Segundo Marsh *et al.* (2000), considerável atenção deve ser dada à padronização dos parâmetros ligados ao processamento das amostras, pois qualquer diferença detectada entre os padrões das comunidades microbianas é atribuída a diferenças na estrutura gênica das comunidades e não a diferenças na preparação de amostras.

Assim, Ogram (2000) sugere que um único método para a extração e purificação do DNA oriundo dos mais variados matizes ambientais seria de grande proveito para o avanço da utilização generalizada das ferramentas de biologia molecular.

3.2.8 Extração do DNA do solo

Os primeiros requisitos da maioria dos métodos moleculares utilizados nos estudos de ecologia microbiana e os primeiros obstáculos a serem superados são a extração e a purificação dos ácidos nucleicos. As técnicas de extração do DNA das amostras naturais envolvem basicamente a quebra ou digestão das paredes e membranas celulares, o que possibilita a liberação do material genético da célula. A eficiência na lise das células, a purificação e o tamanho dos ácidos nucleicos isolados são cruciais para o sucesso na aplicação desses métodos (OGRAM, 2000).

Para o isolamento e purificação de ácidos nucleicos, é necessário separá-los efetivamente dos outros constituintes celulares. É também fundamental manter a integridade das moléculas, que devem permanecer inalteradas durante o procedimento de extração, pois as informações contidas no DNA/RNA dependem diretamente de sua sequência. Para o DNA, teoricamente, a extração de moléculas do tamanho do cromossomo seria ideal. Apesar de ser possível, especialmente para algumas aplicações, as quantidades obtidas não são suficientes para a maioria dos usos. Deve-se, portanto, fazer um balanço entre a qualidade e praticidade. Existem vários métodos descritos na literatura, e a escolha depende do balanço entre a praticidade, qualidade e a finalidade de uso do ácido nucleico (LUCIANO, 2004).

A aplicação de técnicas moleculares ao estudo da microbiologia do solo se desenvolveu posteriormente as análises em amostras aquáticas devido a problemas metodológicos para a extração do material genético do solo. Dois fatores são importantes na extração de ácidos nucleicos do solo: (1) a eficiência da extração, que se realiza mediante processos físicos, químicos e enzimáticos que asseguram a ruptura das resistentes estruturas celulares características de alguns microrganismos do solo ou dos esporos; e (2) a eliminação de substâncias contaminantes (por exemplo, ácidos húmicos), que são extraídas juntamente com os ácidos nucleicos e que interferem nas análises moleculares posteriores (O'DONELL, *et al.*, 1999, apud NOGALES, 2005).

De acordo com Nogales (2005), muitas das dificuldades técnicas foram resolvidas satisfatoriamente e atualmente, existem métodos comerciais de extração de DNA de solos que são bastante eficazes na maioria dos casos, ainda que não exista um método universal para a extração de ácidos nucleicos que seja aplicável a todos os tipos de solos.

3.3 Estudos de diversidade microbiana dos solos

Existem diversas técnicas e métodos que podem ser utilizados para se avaliar a diversidade microbiana de um solo. Basicamente, as técnicas podem ser divididas em técnicas tradicionais de microbiologia, onde o cultivo dos microrganismos tem papel-chave, e técnicas moleculares, que se baseiam em análises de biologia molecular, isto é, no estudo das macromoléculas orgânicas dos seres vivos como os ácidos nucleicos e as proteínas. Dentro das técnicas moleculares pode-se ainda fazer uma subdivisão entre duas categorias: técnicas moleculares usuais, que envolvem os princípios básicos da biologia molecular, ou seja, PCR, clonagem e seqüenciamento, e técnicas modernas, que permitem a obtenção de milhares de informações sobre diversos genes de maneira muito rápida, sendo este o tipo de técnica que abrange a utilização dos microchips filogenéticos.

A Figura 12 esquematiza as subdivisões das técnicas para estudos de diversidade microbiana.

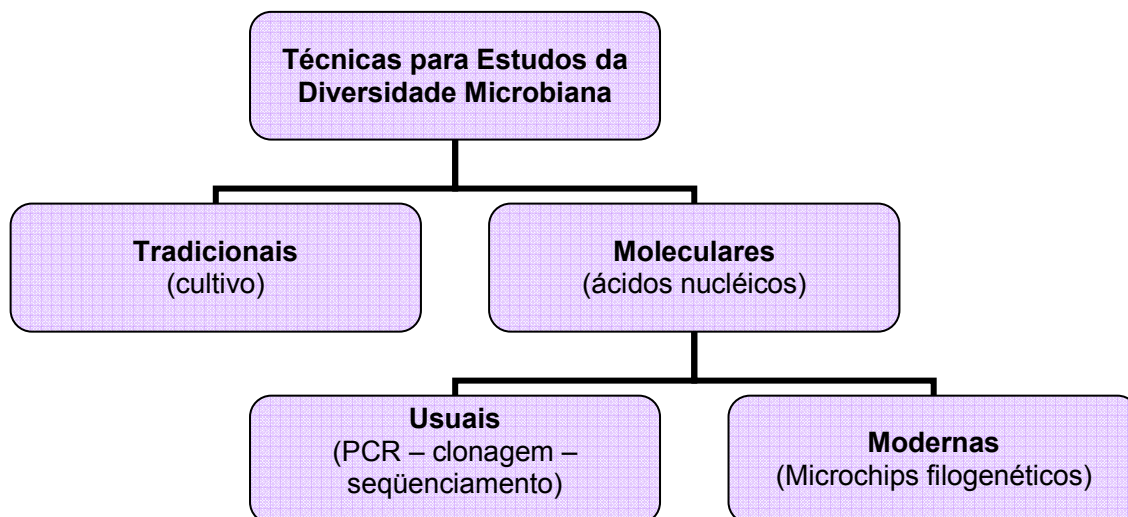


Figura 12 – Tipos de técnicas para estudos de diversidade microbiana.

A seguir, serão abordadas cada uma dessas técnicas.

3.3.1 Técnicas tradicionais para estudos de biodiversidade

Segundo Amann *et al.* (1995), dentre as ciências destinadas a estudar as diferentes formas de vida do nosso planeta, a microbiologia foi a última a se estabelecer. Uma vez eliminados os organismos que podem ser estudados pela botânica e zoologia, os que sobram são alvo dos microbiologistas. São geralmente pequenos organismos que somente podem ser visualizados com a utilização de equipamentos especiais. Em contraste com as plantas e os animais, a morfologia dos microrganismos é geralmente muito simples para servir como base de classificação e para permitir uma identificação confiável.

Dessa maneira, até pouco tempo atrás, a identificação de microrganismos requeria o isolamento de culturas puras, seguido de inúmeros testes das características fisiológicas e bioquímicas desses organismos. O sucesso da identificação estava extremamente ligado com a capacidade de cultivar microrganismos.

Borneman *et al.* (1996) explicam que o método tradicional para a identificação de bactérias baseia-se nos seus principais meios de obtenção de energia, suas exigências nutricionais e meio de cultivo para seu crescimento, complementando-se o estudo com observação microscópica. No entanto, estima-se que apenas de 1 a 10% dos microrganismos possam ser isolados por método de cultura, seja em meio líquido, seja em meio sólido.

A esse propósito, Amann *et al.* (1995) fizeram uma revisão da literatura e apresentaram uma tabela com valores de culturabilidade de bactérias de diferentes habitats, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Culturabilidade de bactérias em diferentes habitats, determinada como o percentual de bactérias cultiváveis em relação a contagem total de células.

Habitat	Culturabilidade (%)
Água do mar	0,001 – 0,1
Água doce	0,25
Lagos mesotróficos	0,1 – 1
Estuários não-poluídos	0,1 – 3
Lodos ativados	1 – 15
Sedimentos	0,25
Solo	0,3

O meio de cultura é o suporte que permite que os microrganismos se desenvolvam, a fim de permitir seu estudo. Em princípio, as células encontram nesse meio todos os componentes indispensáveis para sua multiplicação; mas nesse meio há também elementos que permitirão privilegiar um gênero de bactéria em detrimento de outro. Assim, o meio de cultura atua como um agente seletor de grupos particulares.

Além disso, segundo Reis Junior *et al.* (2002), metodologias de isolamento e cultivo fornecem informações limitadas com necessidade de um maior refinamento. Ainda de acordo com os autores, as limitações às técnicas tradicionais de detecção e identificação de microrganismos são ainda maiores quando se quer estudar a diversidade de microrganismos associada a um determinado ambiente.

Segundo Borneman *et al.* (1996), grandes esforços são feitos pelos microbiologistas do mundo inteiro para identificar os microrganismos presentes em amostras ambientais. Esse forte interesse baseou-se nas observações de diversos laboratórios de que a maioria das bactérias existentes nos ambientes naturais não podem ser cultivadas com as técnicas atuais. Assim, fica evidente a necessidade de novas metodologias para a identificação e classificação dos microrganismos.

Como alternativa para métodos tradicionais de cultivo, foram desenvolvidas várias técnicas, dentre as quais se destacam aquelas baseadas nos ácidos nucleicos (REIS JUNIOR *et al.*, 2002).

3.3.2 Técnicas moleculares para estudos de biodiversidade

Segundo Silveira (2004), a partir da década de 80, foram desenvolvidas novas metodologias para análises de diversidade microbiana dos solos. Tais metodologias utilizam o DNA genômico total extraído diretamente de um ambiente natural e são denominadas de técnicas moleculares.

Segundo Kuske *et al.* (1997), a análise filogenética da sequência genética da menor subunidade do RNA ribossomal (rRNA) constitui-se numa técnica molecular bem reconhecida para definição da composição de uma comunidade microbiana de

um determinado ambiente. Essa análise permite a identificação de espécies microbianas sem necessitar de cultivo prévio, e estudos usando essa metodologia em diferentes ambientes identificaram novos microrganismos que podem ser abundantes ou significantes fisiologicamente. Esses estudos confirmaram também as observações de que o número de espécies de bactérias que se pode cultivar é apenas uma fração da diversidade presente.

Um exemplo da efetividade dos métodos moleculares em oposição aos tradicionais pode ser verificado no trabalho de Torsvik *et al.* (1990). Num estudo sobre as populações bacterianas do solo sob uma floresta decídua, os autores encontraram 4.000 diferentes genomas, sendo esta uma estimativa 200 vezes maior do que a obtida através de análises convencionais. Neste estudo, realizado em 1990, pôde-se verificar a importância dos métodos moleculares para um estudo mais completo e fiel da biodiversidade em um determinado ambiente. Ressalta-se ainda que, passados 18 anos, as ferramentas moleculares tiveram grande evolução, constituindo-se hoje num instrumento essencial para esses tipos de estudos.

Como dito anteriormente, as técnicas moleculares podem ser separadas em duas categorias, que utilizam abordagens diferentes para analisar filogeneticamente a sequência do gene rDNA. O primeiro grupo utiliza as ferramentas clássicas da biologia molecular: amplificação do DNA por PCR, seguida de clonagem e sequenciamento da sequência. Já o segundo grupo abrange técnicas mais modernas, que permitem a análise de genomas ou mesmo metagenomas completos em apenas um experimento.

Os itens a seguir tratarão dessas duas abordagens individualmente.

3.3.2.1 Técnicas moleculares usuais

A biologia molecular clássica baseia-se em três etapas: PCR, clonagem molecular e sequenciamento. A PCR tem a função de propiciar um aumento significativo na concentração de genes específicos e de interesse. Já a clonagem insere tais genes em um plasmídeo, formando o DNA recombinante (plasmídeo + gene a ser clonado) que será inserido numa bactéria hospedeira, que se multiplicará, formando cópias idênticas do gene. O sequenciamento de DNA é o processo que determina a ordem dos nucleotídeos em uma amostra.

Após amplificações do DNA genômico via PCR, a clonagem e o sequenciamento do gene do DNA/RNA ribossomal (rDNA/rRNA) tornam possível a identificação dos microrganismos ainda desconhecidos e não cultivados, permitindo também uma avaliação da diversidade microbiana do ambiente (SILVEIRA, 2004).

Reis Junior *et al.* (2002) consideram a clonagem e sequenciamento do gene do 16S rRNA como um método poderoso para a exploração da diversidade microbiana em amostras naturais. Com a utilização da PCR, fragmentos do gene do 16S rRNA, presentes em amostras complexas, podem ser seletivamente amplificados. Uma biblioteca genômica derivada da amplificação dessas amostras é produzida pelo método de clonagem. Esses clones contêm fragmentos definidos que podem ser rapidamente sequenciados.

Thompson & Oliveira (2006) defendem que o desenvolvimento rápido dos métodos de sequenciamento de DNA e o acúmulo da informação de seqüências em bases de dados públicas de livre acesso permitiram a comparação de seqüências de DNA entre linhagens microbianas, procedimento que atualmente se tornou padrão em sistemática microbiana. As bibliotecas metagenômicas, produtos do aperfeiçoamento da técnica de clonagem molecular, armazenam um conjunto de genomas encontrados na natureza. O advento destas bibliotecas permitiu a comparação entre comunidades bacterianas de locais ou ambientes diferentes.

A seguir, será feita uma pequena explicação sobre as três etapas empregadas pelas técnicas moleculares usuais, a título de conhecimento geral, já que estas técnicas não são o foco do presente trabalho.

→ PCR

Como visto anteriormente, a PCR tem a função de amplificar seqüências específicas do DNA, proporcionando grande quantidade de material genético em pouco tempo. A escolha dos *primers* é essencial para se amplificar uma zona-alvo desejada. Assim, a reação pode ser bastante específica, e permite selecionar uma zona do genoma a ser amplificada, mesmo em casos onde estão presentes diferentes seqüências de DNA na amostra.

O princípio de funcionamento da técnica, os reagentes necessários para sua utilização, suas funções e aplicações estão descritas no item 3.2.7.

→ Clonagem molecular

De maneira simplificada, a clonagem molecular consiste em introduzir um fragmento de DNA ou um gene num organismo hospedeiro, na maioria das vezes um unicelular (bactérias ou leveduras), que ao se multiplicar, dará origem a uma série de células (clones) contendo todas uma cópia do gene desejado.

Uma vez que as bactérias e leveduras são capazes de se multiplicar rapidamente graças aos mecanismos de divisão celular, esse método permite produzir numerosas cópias de um determinado gene.

Os chamados vetores de clonagem molecular são moléculas de DNA capazes de amplificar, em centenas de cópias, a informação genética que neles foi inserida. Existem diferentes tipos de vetores, cada um possuindo particularidades que lhe são próprias. Estes vetores constituem parte essencial no processo de clonagem, que também conta com a atuação de diferentes enzimas, tendo destaque as enzimas de restrição e a ligase.

Os plasmídeos são pequenas moléculas de DNA de cadeia dupla, que contêm os elementos necessários à sua replicação e um gene que confere resistência a um antibiótico. Podem estar presentes em duas ou mais cópias na célula e podem variar entre 5 e 400 kb (kilobases). Estes plasmídeos, sendo capazes de amplificar o segmento de DNA neles inserido, são utilizados como vetores de clonagem.

A Figura 13 apresenta um esquema simplificado de clonagem molecular, utilizando um plasmídeo como vetor de clonagem.

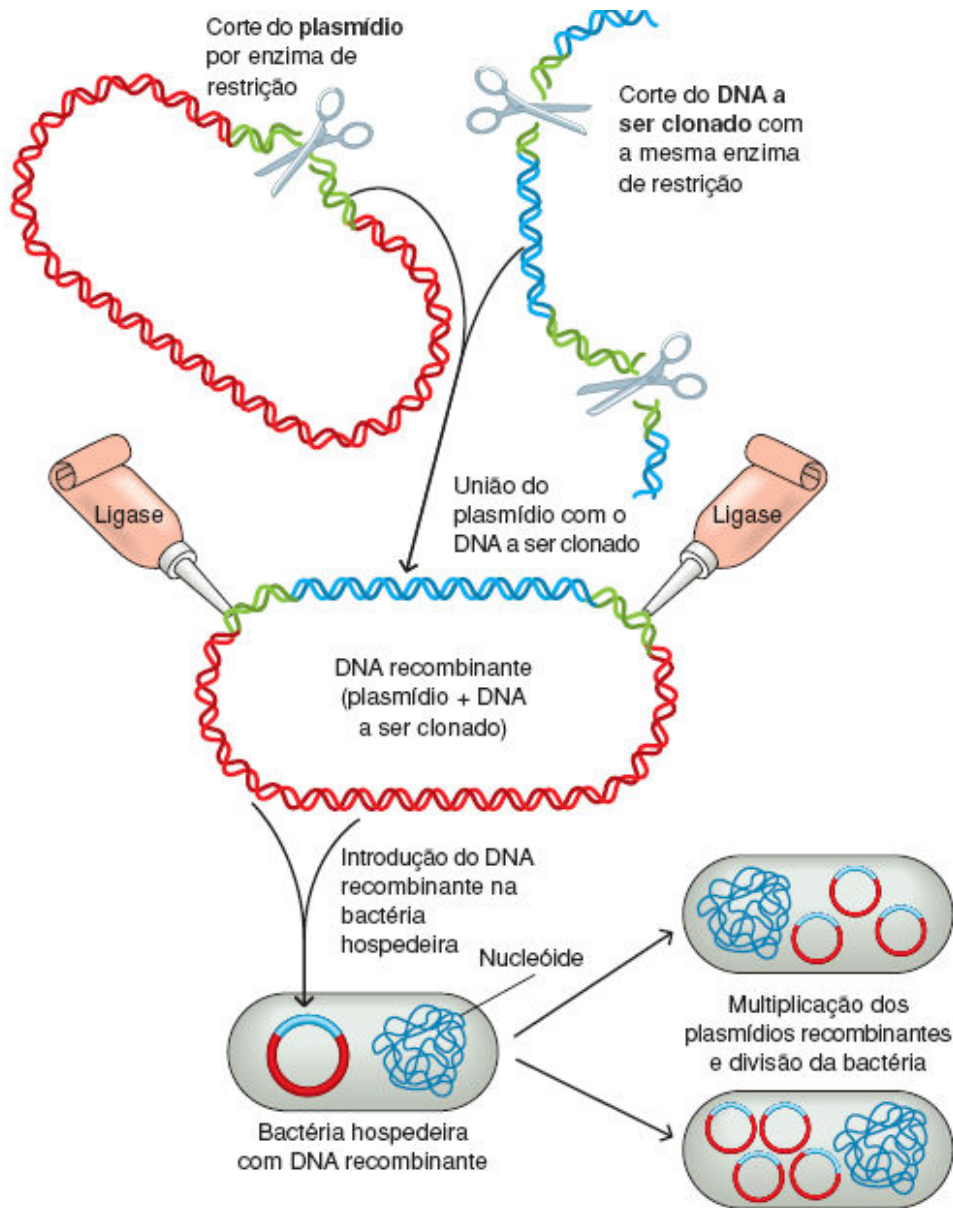


Figura 13 – Esquema de clonagem molecular.

→ Seqüenciamento

O seqüenciamento do DNA é a determinação da sucessão de nucleotídeos que o compõe. Existem diversos métodos para a realização dessa tarefa, sendo um dos mais utilizados o Método de Sanger, também conhecido como Método Didesoxi ou Terminadores de Cadeia.

Sua estratégia consiste na adição de nucleotídeos modificados, chamados didesoxirribonucleotídeos trifosfatados (ddNTP), que impedem o crescimento de um fragmento de DNA em replicação pela DNA polimerase após sua adição.

Os ddNTP se diferenciam dos desoxirribonucleotídeos “normais” (dNTP) pela ausência de um grupo –OH na posição 3'. Assim, quando a DNA polimerase utiliza um ddNTP, ela não pode mais continuar a adicionar outros nucleotídeos, interrompendo a síntese da fita de DNA.

Neste método, uma fita simples de DNA (cadeia molde) que se deseja seqüenciar é hibridizada com um *primer* e na presença da DNA polimerase ocorre a elongação da molécula de DNA. Utiliza-se ainda baixas concentrações de ddNTPs e altas concentrações de dNTPs.

São preparadas quatro misturas de reação e em cada uma delas um dos ddNTP é incorporado aleatoriamente na posição do dNTP correspondente, provocando a terminação da polimerização. Desta forma, cada mistura de reação produzirá cadeias prematuramente terminadas de acordo com toda ocorrência de um didesoxirribonucleotídeo adicionado.

A inclusão de marcadores fluorescentes com diferentes cores para cada tipo de ddNTP permite a distinção das cadeias truncada pela respectiva fluorescência. Assim, todas as seqüências truncadas que terminem com um ddGTP podem ter fluorescência de cor amarela, as terminadas com ddATP com cor vermelha, e assim por diante, independentemente dos seus tamanhos. Por eletroforese das seqüências truncadas em gel de poliacrilamida, separam-se as diferentes cadeias simples de DNA (as quais diferem entre si apenas por um nucleotídeo). A ordem em que os diferentes fragmentos passam pelo detector de fluorescência indica a seqüência da cadeia de DNA complementar à cadeia usada como molde, ou seja, a seqüência obtida não é a da cadeia molde, mas sim a da sua cadeia complementar.

3.3.2.2 Técnicas moleculares modernas

Em um dado sistema biológico, milhares de genes e seus produtos (RNA e proteínas) funcionam de maneira complexa e bem orquestrada. No entanto, os métodos usuais da biologia molecular geralmente trabalham na base de “um gene a cada experimento”, o que significa que o escopo é bastante limitado e que uma imagem ampla do funcionamento dos genes é dificilmente obtida. Além disso, o procedimento PCR-clonagem-seqüenciamento torna-se inviável quando se deseja analisar a biodiversidade de um determinado ambiente (grande quantidade de genomas diferentes), tanto pelo tempo que seria gasto para tal análise, quanto pelos custos.

Segundo Gilbride *et al.* (2006), as técnicas modernas de biologia molecular permitem a análise simultânea de diversos genes, permitindo a comparação de estruturas de comunidades microbianas diferentes, a avaliação da evolução de uma comunidade no tempo, a sucessão das populações bacterianas, além dos estudos de biodiversidade.

Atualmente observa-se uma notável mudança na escala da pesquisa de microbiologia molecular, que para Lucchini *et al.* (2005) é o início da era da “grande ciência”. Nas décadas passadas, projetos de pesquisas inteiros limitavam-se ao seqüenciamento de um único gene; nos dias de hoje, uma etapa de um projeto já

pode conter a descrição de genomas inteiros, graças à utilização de novas ferramentas moleculares.

Dentre as técnicas modernas de biologia molecular, ganham destaque as chamadas tecnologias “*high throughput*”, que permitem a avaliação de milhares de genes simultaneamente, fornecendo aos pesquisadores uma grande quantidade de informações a respeito das comunidades microbianas de um determinado ambiente, num curto espaço de tempo.

O desenvolvimento e o uso de tecnologias *high throughput*, que geralmente utilizam a amplificação por PCR e os microchips de DNA, proporcionaram uma maneira de examinar e selecionar rapidamente a composição e as atividades de microrganismos (GILBRIDE *et al.*, 2006).

Os microchips de DNA são, portanto, ferramentas moleculares que permitem o processamento de múltiplas amostras e o monitoramento de milhares de genes em um único experimento. Quando utilizado para a detecção de microrganismos, a técnica frequentemente envolve amplificações dos genes-alvo por PCR para melhorar a sensibilidade de detecção (LEE *et al.*, 2006).

A tecnologia dos microchips é baseada na capacidade que as seqüências de ácidos nucleicos têm de hibridizar, ligando-se uma nas outras (LUCCHINI, 2001). A amostra ambiental a ser analisada terá seu DNA ou RNA extraído e incubado com o microchip em condições onde seqüências complementares podem hibridizar. Uma vez que o material hibridizado foi anteriormente marcado com uma componente fluorescente ou radioativo, a presença de fluorescência/radioatividade indica a existência de uma seqüência-alvo específica (GILBRIDE *et al.*, 2006).

O item 3.4 abordará os princípios de funcionamento dos microchips de DNA de forma mais detalhada.

3.3.3 Técnicas tradicionais x técnicas moleculares

A aplicação de técnicas de biologia molecular ao estudo da microbiologia do solo representou um grande avanço no conhecimento desses ecossistemas. O reconhecimento da presença de uma grande diversidade de microrganismos no solo, que antes eram totalmente desconhecidos porque não haviam sido cultivados em laboratório, é apenas o começo de uma nova era na microbiologia molecular dos solos. O grande objetivo atual é determinar a função dos diferentes microrganismos que constituem as comunidades edáficas. A integração de técnicas de estudo da microbiologia mais tradicional com metodologias moleculares, incluindo os avanços obtidos com as técnicas de genômica e metagenoma, sem dúvida contribuirá para um melhor conhecimento do solo (NOGALES, 2005).

Nogales (2005) acredita que após alguns anos de relativo abandono das técnicas de cultivo, os microbiólogos voltaram a reconhecer a importância da obtenção de cultivos de laboratório para poder estudar a fisiologia dos microrganismos e determinar, portanto, seu possível papel no funcionamento do ecossistema.

O autor defende que apesar da importância das análises de diversidade microbiana utilizando técnicas moleculares, ainda existe bastante dificuldade em se entender o papel dos microrganismos do solo no funcionamento do ecossistema, particularmente daqueles que não são cultivados em laboratório e para os quais se desconhece totalmente suas capacidades metabólicas.

Outro fator importante que deve ser discutido é que apesar de as ferramentas moleculares fornecerem nova perspectiva para as avaliações da diversidade microbiana dos solos, elas não possibilitam que organismos, com potencial valor biotecnológico, sejam cultivados e trabalhados, mostrando a necessidade de se desenvolver técnicas de cultivo que permitam o estudo e a utilização desses organismos para propósitos biotecnológicos (REIS JUNIOR *et al.*, 2002).

Assim, a combinação de diferentes técnicas de cultivo e análises fisiológicas e bioquímicas com a utilização de técnicas moleculares baseadas no 16S rRNA torna-se de grande importância para a determinação da função dos microrganismos no ambiente e para a indústria da biotecnologia.

3.4 Microchips de DNA

A tecnologia dos microchips de DNA promete monitorar o genoma como um todo, em um único chip, para que os pesquisadores possam ter um bom panorama das interações entre milhares de genes simultaneamente.

As terminologias que são usadas na literatura para descrever essa tecnologia incluem, mas não se limitam a: microchips de DNA, biochips, *microarray* de DNA, microarranjos de DNA. Os artigos em língua francesa se referem à tecnologia como *microdamier à ADN*, *puces à ADN* ou *biopuces à ADN*. Já no inglês, os termos mais utilizados são *DNA microarray*, *gene chip* e *DNA chips*.

Um microchip de DNA consiste em um arranjo pré-definido de moléculas de DNA (fragmentos de DNA genômico, DNA complementar ou oligonucleotídeos) quimicamente ligadas a uma superfície sólida, usualmente lâminas de microscópio revestidas com compostos que conferem carga positiva, podendo também ser preparado em membranas de *nylon* positivamente carregadas. As moléculas de DNA fixadas na lâmina são chamadas de sondas (“*probes*” em inglês).

Os microchips de DNA são utilizados na detecção e quantificação de ácidos nucléicos provenientes de amostras biológicas, as quais são postas para hibridizar com o DNA fixado no *array* (hibridização por complementariedade de bases). Dependendo do objetivo da análise, o ácido nucléico da amostra pode se apresentar em diversas formas, tais como: produtos de PCR, DNA genômico, RNA total, DNA complementar ou oligonucleotídeos. Esse material, representativo da amostra, é chamado de sequência-alvo (“*target*” no inglês), uma vez que se deseja detectá-lo (CALL *et al.*, 2003).

A detecção é possível devido ao fato das sequências-alvo estarem “marcadas” com fluorocromos Cianina 3 (Cy3, coloração verde) ou Cianina 5 (Cy5, coloração vermelha) quando utiliza-se *microarrays* em vidro ou com o isótopo ³³P quando os *arrays* são preparados em membranas de *nylon*.

Uma enorme quantidade de sondas diferentes podem ser imobilizadas em um único microchip, permitindo a detecção simultânea de grande variedade de microrganismos em uma amostra (GUSCHIN *et al.*, 1997).

A leitura dos resultados é feita através da imagem de hibridização, que é obtida por meio de escâner a laser (para os fluorocromos) ou leitor de fósforo (para o isótopo ^{33}P). A Figura 14 traz um exemplo de imagem de hibridização de um microchip para oito amostras ambientais.

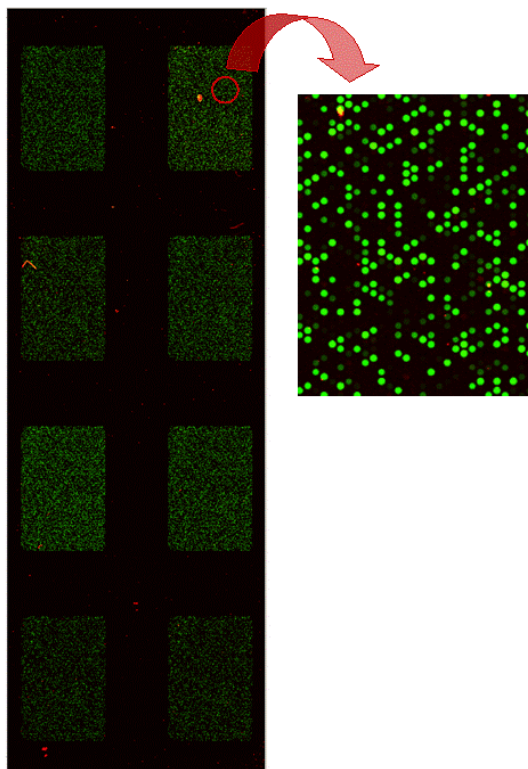


Figura 14 – Exemplo do resultado da hibridização de um microchip filogenético.

Os microchips são preparados com a utilização de robôs de alta precisão que aplicam as diferentes amostras de DNA em diminutos pontos (*spots*) imobilizados em uma matriz de gel de poliacrilamida ligada à superfície de uma placa de vidro, com densidade aproximada de 10.000 pontos/cm² (YERSHOV *et al.*, 1996). Pode-se visualizar um robô utilizado na preparação dos chips na Figura 15.

De acordo com Lucchini *et al.* (2001), a aplicação de tecnologias de robóticas na biologia molecular deu um grande impulso no desenvolvimento dos *microarrays*. Graças a essas tecnologias, conseguiu-se uma grande densidade de *spots* de DNA nas lâminas de vidro, permitindo a construção de *microarrays* contendo mais de 50.000 sondas numa única lâmina de microscópio.

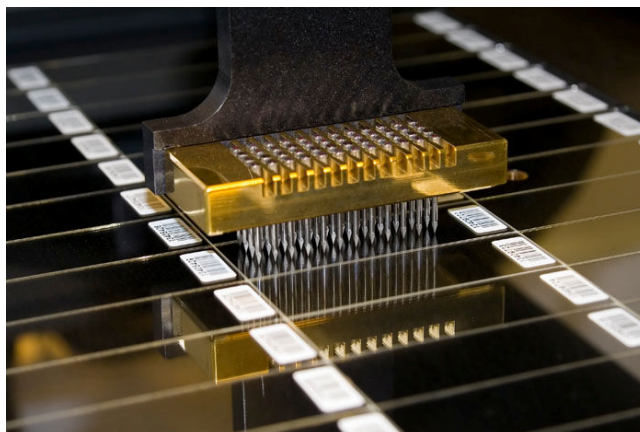


Figura 15 – Robô preparando os *arrays* dos microchips de DNA.

O arranjo ou *array* consiste exatamente nessa disposição ordenada dos *spots* (sondas). Centenas ou milhares de moléculas de DNA, de sequência conhecida, são ordenadas sobre o suporte. Isso proporciona um meio para combinar amostras de DNA conhecidas e desconhecidas, baseando-se nas regras de pareamento das bases nitrogenadas e automatizando o processo de identificação dos genes desconhecidos.

Em geral, os arranjos são descritos como *macroarrays* ou *microarrays*, estando a diferença no tamanho do *spot* das amostras. Nos *microarrays*, as dimensões dos *spots* são inferiores a 200 micra de diâmetro, e esses arranjos contêm geralmente milhares de *spots*. É usual *spots* com 100 micra de diâmetro, distanciados por aproximadamente 50 micra (JANSSEN, 2007).

O processo de análise de amostras ambientais com utilização de microchips de DNA envolve, basicamente, quatro etapas:

- a) Criação do microarranjo com sondas de DNA por um robô;
- b) Hibridização com o DNA alvo da amostra, marcado com fluorescência;
- c) Leitura através do escâner;
- d) Interpretação dos resultados.

Os microchips de DNA podem permitir a identificação de uma estirpe específica dentro de uma distribuição de organismos de uma amostra ambiental (CALL *et al.*, 2003) ou podem ser usados para analisar se genes específicos estão ativos ou inativos em uma amostra particular (WEINER *et al.*, 2003). Dependendo da sua função, a nomenclatura dos microchips pode variar. Assim, no primeiro caso, é chamado de microchip filogenético e no segundo de microchip funcional.

Os microchips filogenéticos contêm sondas de DNA que vão permitir a identificação dos microrganismos em nível de espécie, gênero e família, dependendo da especificidade da sonda. Assim, são esses os microchips utilizados nos estudos de biodiversidade de um ambiente e permitem determinar a árvore filogenética dos microrganismos presentes na amostra.

Diferentemente dos microchips filogenéticos, os microchips funcionais contêm sondas específicas de genes, e assim permitem a identificação dos genes ativos ou inativos (expressão gênica) em uma determinada amostra ambiental.

O tipo de DNA que compõe as sondas varia também conforme o tipo de microchip. Assim, geralmente as sondas são compostas de oligonucleotídeos no caso dos microchips filogenéticos, e por produtos de PCR de genes específicos nos microchips funcionais (LUCCHINI *et al.*, 2001).

Nos microchips filogenéticos, os oligonucleotídeos podem ser depositados mecanicamente no substrato (lâmina de vidro) ou construídos *in situ* através de técnicas de litografia (CALL *et al.*, 2003). Os oligonucleotídeos sintetizados para serem utilizados nos microchips devem ser purificados por eletroforese em gel ou por cromatografia líquida de alta performance. Essa exigência aumenta o controle sobre a qualidade da estirpe, assegurando grande especificidade (REIS JUNIOR *et al.*, 2002).

Apesar do conceito relativamente simples, os microchips de DNA são ferramentas poderosas para a detecção e caracterização de microrganismos. A detecção direta de ácidos nucleicos de bactérias é viável, mas pode implicar em falta de sensibilidade para as análises de amostras ambientais. No entanto, quando a quantidade de ácido nucleico não é um fator limitante, os *microarrays* demonstram grande capacidade como ferramenta de detecção, sendo um instrumento para descobertas. Quando associado com a técnica de PCR, os microchips apresentam um aumento de sensibilidade e têm a flexibilidade de discriminar produtos de múltiplas reações de PCR, tendo grande aplicação na detecção de microrganismos baseando-se em seqüências de 16S rDNA (CALL *et al.*, 2003).

A tecnologia de microchips de DNA tem grande potencial para a elucidação de vários aspectos da ecologia microbiana dos solos, incluindo identificação de variações na estrutura de comunidades entre diferentes amostras, identificação de grupos filogenéticos que podem estar ativos ou sem atividade durante determinado período ou sob determinado tratamento e identificação de diferenças entre estirpes isoladas de diferentes ambientes (MURRAY *et al.*, 1999, apud REIS JUNIOR *et al.*, 2002). Além disso, essa técnica tem impulsionado de maneira importante a pesquisa de genômica funcional dos diferentes organismos, desde bactérias até o homem, incluindo situações normais e patológicas (câncer, doenças autoimunes, doenças degenerativas entre outras).

3.5 Aplicações dos microchips

Os microchips de DNA representam o último avanço nas tecnologias moleculares, proporcionando oportunidade sem iguais na detecção múltipla de ácidos nucleicos. Originalmente projetados para seqüenciamentos em larga-escala, diagnósticos clínicos e análises genéticas, os *microarrays* também apresentam um enorme potencial para a análise de comunidades microbianas, a detecção de organismos patogênicos e o monitoramento de processos em ciências ambientais básicas e aplicadas (SMALL *et al.*, 2001).

Boivin-Masson *et al.* (2006) destacam algumas aplicações dos microchips de DNA em diversos campos como o descobrimento de novas drogas, pesquisas

toxicológicas, diagnósticos de doenças, estudo da biodiversidade, identificação de bactérias, classificação dos microrganismos (taxonomia), detecção de mutações, dentre outras.

3.5.1 Meio ambiente e saneamento

Na área sanitária e ambiental, os microchips filogenéticos podem ser utilizados em análises de qualidade da água ou do solo. Um exemplo são as pesquisas desenvolvidas pelo Instituto de Pesquisa em Biotecnologia do Conselho Nacional de Pesquisas do Canadá (IRB/CNRC), onde foi estudada a aplicação de um microchip de DNA especialmente construído para identificar rápida e precisamente os microrganismos patogênicos presentes na água, obtendo-se os resultados em poucas horas. Este biochip é fabricado fixando-se sondas genéticas sintéticas únicas para cada patógeno numa superfície sólida. Em seguida, o biochip é exposto ao DNA extraído das amostras de água. Se há presença de algum patógeno na água, seu DNA se fixa à sonda complementar e um sinal fluorescente revela sua presença. Assim, é possível supervisionar a qualidade das águas dos rios, águas subterrâneas e água potável (CANADÁ, 2006).

Ainda na linha de pesquisa de identificação de patógenos aquáticos, Lee *et al.* (2006) explicam que as águas residuárias domésticas são uma das mais comuns contribuições para a poluição da água potável e recreacional e, no entanto, tais efluentes são raramente monitorados quanto a seus patógenos devido à disponibilidade limitada de ferramentas rápidas e precisas para sua detecção. Os ensaios convencionais de detecção de patógenos, tal como o ensaio de coliformes, apresentam limitações técnicas. Esses ensaios podem apenas utilizar os coliformes como um indicador de contaminação, mas não podem identificar os patógenos presentes no ambiente. Além disso, o cultivo de microrganismos indicadores de contaminação necessita de tempo e trabalho.

Lee *et al.* (2006) pesquisaram alternativas mais precisas e independentes de cultivo para o monitoramento dos patógenos aquáticos, dentre elas a utilização de microchips filogenéticos combinado com PCR. Foi utilizado esgoto bruto e efluente tratado (desinfecção UV) obtidos de uma Estação de Tratamento de Efluentes Domésticos cujo tratamento secundário era baseado nos processos de lodos ativados. O DNA das amostras foi extraído, amplificado por PCR e colocado para hibridizar com um microchip contendo 24 sondas de oligonucleotídeos que caracterizavam grupos taxonômicos específicos.

Os resultados da imagem de hibridização permitiram identificar a presença de 6 grupos patogênicos no esgoto bruto (*A. hydrophila*, *B. cereus*, *C. perfringens*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*), além de *E. coli*. Quanto ao esgoto tratado, observou-se a presença dos grupos *A. hydrophila*, *C. perfringens*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* e *E. coli*. As imagens dos microchips para os ensaios de esgoto bruto e esgoto tratado apresentaram semelhança no quesito presença/ausência de determinado grupo. Os autores puderam concluir que a abundância relativa dos grupos bacterianos não apresenta uma mudança notável devido ao processo de tratamento, mas o número absoluto cai drasticamente, como foi observado por outros ensaios realizados. Os microchips mostraram-se uma ferramenta rápida e precisa

para a identificação dos patógenos, desde que utilizada a amplificação por PCR do DNA extraído das amostras antes da hibridização, como forma de aumentar a sensibilidade de detecção dos microchips (LEE *et al.*, 2006).

Straub e Chandler (2003) publicaram um artigo que visa estabelecer um sistema unificado para a detecção de organismos patogênicos aquáticos. Os autores apontam algumas dificuldades para o desenvolvimento de um método universal: as diferenças entre os principais grupos de patógenos (vírus, bactérias, protozoa); concentrar de maneira eficiente amostras de grande volume de água para a detecção de baixa concentração de material genético de determinados grupos; remover os inibidores das amostras; e padronizar o método final de detecção. A integração de tecnologias diversas num método de detecção único, universal e simples representaria um grande avanço para a saúde pública e para as análises microbiológicas de qualidade da água. Para esses autores, os avanços nas técnicas de coleta de amostras, purificação de ácidos nucleicos e microchips de DNA podem formar a base do método universal de detecção de patogênicos aquáticos.

No campo da toxicologia, os microchips de DNA vêm sendo empregados em estudos de toxicogenômica, que consistem na mistura de genômica funcional e toxicologia molecular. O objetivo é analisar simultaneamente milhares de genes de um organismo exposto a agentes tóxicos para buscar quais genes causam suscetibilidade ao dano. Além disso, busca-se encontrar correlações entre respostas a substâncias tóxicas e mudanças no perfil genético de organismos expostos a tais substâncias. Assim, os perfis de expressão de genes poderiam resultar na geração de biomarcadores de exposição a um perigo ambiental (LÓPEZ, 2004).

Estudos realizados por Boivin-Masson *et al.* (2006) utilizaram microchips de DNA para a detecção de um gene específico na pesquisa da biodiversidade de organismos fixadores de nitrogênio na rizosfera. Segundo os autores, inúmeros genes de interesse (biodegradação, fixação do nitrogênio, patogenicidade, resistência a antibióticos, etc.) estão presentes em bactérias taxonomicamente diversas, que vivem em ambientes variados. Na medida em que várias dessas bactérias não são cultiváveis, a utilização da tecnologia de microchips de DNA se mostra particularmente promissora para selecionar os genes de interesse nas amostras biológicas.

No domínio dos estudos de biodiversidade, Sanguin *et al.* (2005) conduziram experimentos para o desenvolvimento e validação de um protótipo de *microarray* filogenético baseado em 16S rRNA. A abordagem do *microarray* foi proposta com o objetivo de obter alta eficiência nas análises de comunidades microbianas, fornecendo um retrato instantâneo da diversidade microbiana em diferentes condições ambientais. O protótipo desenvolvido continha 122 sondas que detectavam diversos níveis taxonômicos, de filo a espécie. Após a validação do microchip com culturas puras de bactérias, os autores testaram o microchip com uma amostra ambiental (comunidade bacteriana da rizosfera do milho), previamente amplificada por PCR. Os resultados obtidos com o *microarray* foram comparados aos resultados obtidos por clonagem-sequenciamento do mesmo DNA, e demonstrou-se que o *microarray* permitiu a identificação de todas as seqüências encontradas pelo processo de clonagem-sequenciamento.

Esse tipo de desenvolvimento permite, por exemplo, avaliar as comunidades bacterianas de solos impactados, identificando quais são as comunidades sobreviventes e que têm potencial para serem utilizadas nos processos de biorremediação. Da mesma forma, é possível se fazer um diagnóstico ambiental da microbiota presente no solo antes da exploração do mesmo, o que permitirá observar as mudanças ocorridas devido a esse impacto. Outra aplicação é quanto à avaliação da saúde ambiental do solo através da definição de populações ou comunidades indicadores de qualidade.

Prosseguindo com os estudos nessa linha, Sanguin *et al.* (2006) publicaram um artigo que investigou o potencial de *microarrays* filogenéticos baseados no gene 16S rRNA para análise dos efeitos da rizosfera do milho em bactérias *Agrobacterium spp* e outras comunidades bacterianas. A rizosfera é um ecossistema complexo e recebe atenção dos pesquisadores porque muitas rizobactérias promovem o crescimento de plantas e contribuem para a ciclagem de nutrientes e para a biodegradação de poluentes. As substâncias liberadas pelas raízes no solo contribuem para o aumento da densidade populacional de bactérias e mudanças significativas na comunidade.

Os autores utilizaram microchips filogenéticos para analisar as comunidades bacterianas presentes em amostras de solo bruto e em amostras de solo da rizosfera de um cultivo de milho, avaliando o efeito da rizosfera nos níveis de comunidades bacterianas totais e sub-comunidades *Agrobacterium*.

A comparação dos resultados de hibridização dos *microarrays* mostrou um efeito significativo da rizosfera, com maior predominância de *Agrobacterium spp.* nas amostras de rizosfera, assim como menor prevalência de *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia* e *Planctomycetes*. Concluiu-se que o microchip filogenético desenvolvido no estudo foi capaz de discriminar e caracterizar a composição da comunidade bacteriana de amostras biológicas relacionadas, oferecendo inúmeras possibilidades para a exploração da diversidade bacteriana em ecossistemas.

Segundo Sanguin *et al.* (2006), a maioria dos *microarrays* desenvolvidos até agora se focam nos grupos funcionais de bactérias (nitrificantes, metanogênicas, biodegradadoras de poluentes, redutoras de sulfato, etc.) ou em grupos únicos taxonômicos. No entanto, recentemente percebe-se um movimento na direção de desenvolvimento de microchips filogenéticos para explorar a diversidade bacteriana por completo.

3.5.2 Saúde

Na área médica os microchips de DNA demonstram ser instrumentos bastante úteis na análise do funcionamento dos genes, determinando quais genes específicos estão ativos ou inativos em certo contexto patológico. Essa propriedade é a base de inúmeras aplicações no domínio da medicina como a classificação de doenças, a compreensão dos processos biológicos ou a identificação de alvos para novos medicamentos (THOMAS *et al.*, 2005).

Segundo Thomas *et al.* (2005), existem duas formas principais de aplicação dos microchips de DNA nessa área: i) análise do conteúdo do genoma e detecção de

alguma particularidade, como uma mutação; ii) análise do nível de expressão (atividade) do gene.

De acordo com Fonseca (2005), dentre as múltiplas aplicações dos *microarrays* de DNA em investigação biomédica, contam-se duas de particular relevância em microbiologia: a pesquisa de novas drogas e de novos meios de diagnosticar microrganismos patogênicos.

Segundo informações obtidas no portal *Biotechnology Learning* mantido pelo governo da Nova Zelândia, os cientistas têm usado os *microarrays* para descobrir quais genes estão expressos em diferentes tipos de células. Assim, os microchips podem ser usados para se estudar:

- a) quais genes de uma célula cancerígena estão ativos, em comparação com uma célula saudável;
- b) como células do mesmo tipo respondem a mudanças no ambiente (por exemplo, como uma célula doente responde a um novo hormônio ou medicamento);
- c) quais genes estão ativos em diferentes estágios da mitose (reprodução celular) (NOVA ZELÂNDIA, 2007).

No estudo do genoma, Thomas *et al.* (2005) explicam que os resultados são essencialmente qualitativos. A pesquisa genética é sem dúvida um dos grandes setores abrangidos pelo uso dos microchips, que são muito úteis devida a extrema precisão na identificação de mutações genéticas. A pesquisa de mutações é um ponto crucial no estabelecimento de um diagnóstico e na pesquisa de resistência associada aos microrganismos patogênicos. De fato, algumas zonas do genoma de microrganismos podem variar geneticamente, conferindo aos mesmos resistência a determinadas terapias. Avanços nessas pesquisas são ansiosamente aguardados por médicos, para que possam adaptar o tratamento aos pacientes utilizando os medicamentos adequados.

4. METODOLOGIA

4.1 *Tipo de pesquisa*

O tipo de pesquisa científica adotado no presente trabalho consiste em uma pesquisa metodológica, ou seja, uma pesquisa voltada para a averiguação dos métodos e procedimentos adotados para uma determinada aplicação, neste caso, aplicação dos microchips filogenéticos na determinação da biodiversidade microbiana.

Nesse sentido Demo (2003, p.25) esclarece que “a pesquisa metodológica é um dos horizontes estratégicos da pesquisa como tal, que não se restringe a decorar estatística com seus testes áridos, mas alcança a capacidade de discutir criativamente caminhos alternativos para a ciência e mesmo criá-los”. Para o autor, a pesquisa metodológica é aquela que tem por objetivo determinar os modos de fazer da ciência, seus instrumentos, caminhos e procedimentos.

Assim, o método utilizado nesta pesquisa será a observação e descrição dos procedimentos metodológicos utilizados em laboratório nas aplicações do microchip filogenético para estudos de biodiversidade.

4.2 *Local de trabalho*

A pesquisa da metodologia empregada na utilização de microchips filogenéticos para estudos de biodiversidade será realizada no Laboratório Ampère, que faz parte do Centro Nacional de Pesquisa Científica (CNRS) da França.

O Laboratório Ampère constitui-se numa Unidade Mista de Pesquisa (UMR 5005/CNRS) e foi criado em janeiro de 2007, pela fusão do Centro de Engenharia Elétrica de Lyon, do Laboratório de Automação Industrial e do Grupo de Genômica Microbiana Ambiental. É, portanto, um laboratório multidisciplinar cujos principais estudos abrangem a engenharia elétrica, o eletromagnetismo, a automação, a microbiologia ambiental e suas aplicações.

Os cerca de 100 pesquisadores que trabalham neste laboratório estão distribuídos em três estabelecimentos universitários da cidade de Lyon: o Instituto Nacional de Ciências Aplicadas de Lyon (INSA de Lyon), a Universidade Claude Bernard de Lyon (UCBL) e a École Centrale de Lyon (ECL). É neste último estabelecimento que são desenvolvidas as pesquisas referentes aos microchips filogenéticos.

O Laboratório Ampère é composto por seis equipes de pesquisa que trabalham sobre oito prioridades científicas (Figura 16). É na Equipe de Microssistemas e Microbiologia que será desenvolvido este trabalho, pois é neste local que ocorrem as pesquisas sobre os mecanismos de adaptação ambiental das bactérias em ambientes impactados devido a atividades antropogênicas e os processos de biorremediação de águas e solos contaminados. Para isso, os pesquisadores utilizam técnicas metagenômicas, que permitem acesso total ao genoma dos microrganismos do

ambiente; dentre estas técnicas tem-se os microchips filogenéticos (GENOMENVIRON, 2007).

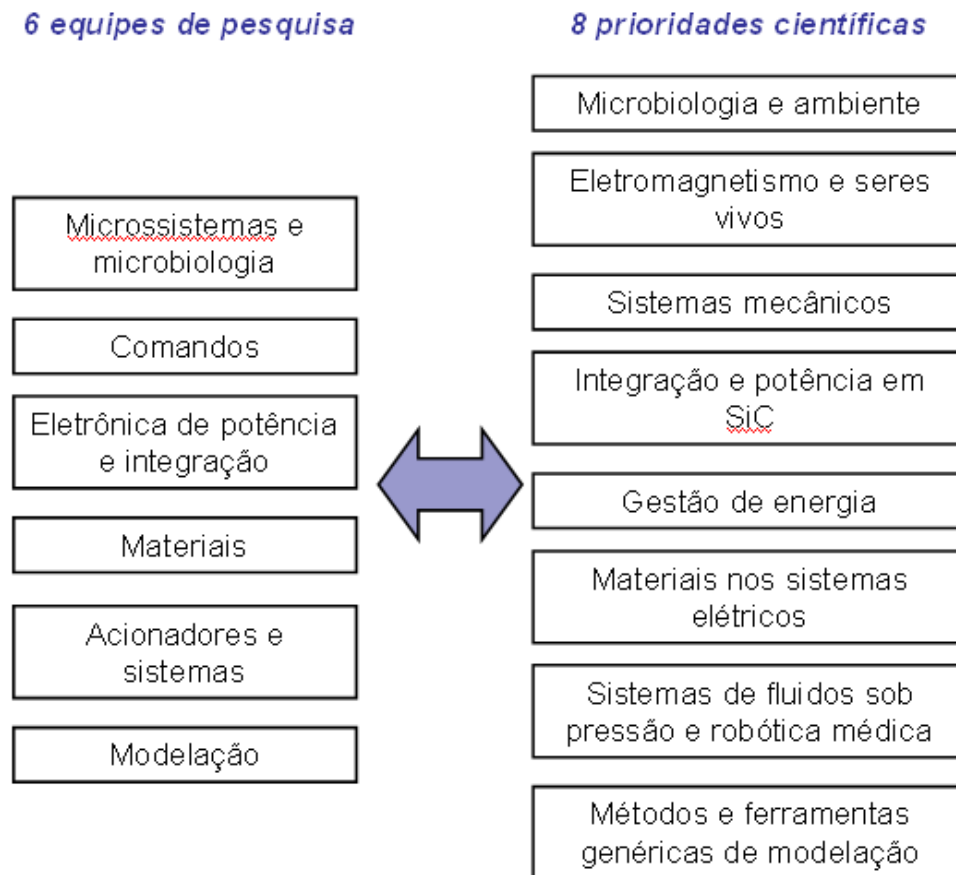


Figura 16 – Equipes e prioridades científicas do Laboratório Ampère.

O laboratório dispõe de equipamentos modernos. A plataforma de microbiologia ambiental conta com 150m², onde estão dispostos, além dos equipamentos clássicos de microbiologia, uma estação de hibridização para taxonomia por DNA; um sistema de análise de lâminas após a hibridização; e equipamentos robóticos de distribuição de soluções de sondas de oligonucleotídeos (AMPÈRE, 2007).

4.3 Universo da pesquisa

A presente pesquisa abrangerá os procedimentos metodológicos que são usados no Laboratório Ampère para realização de estudos de diversidade microbiana de solos através da utilização de microchips filogenéticos. Esses estudos têm como objetivo caracterizar os microrganismos presentes em amostra ambientais de solo, visando verificar adaptações das comunidades microbianas perante processos de contaminação e biorremediação.

4.4 Levantamento de dados

O objetivo principal do trabalho é o estabelecimento de uma metodologia que possa ser utilizada na avaliação da biodiversidade microbiana através da utilização dos microchips filogenéticos.

O instrumento de coleta de dados será observação direta do cotidiano das análises. A coleta dos dados se dará no próprio laboratório.

Segundo Bello (2004), para que o procedimento de observação traga resultados efetivos, deve-se examinar inicialmente o local, determinando quais os procedimentos merecerão registros. Após esta etapa inicial, é necessário o planejamento do método de registro. Para isso, utilizar-se-á registros escritos, anotações feitas durante o procedimento em laboratório, gravações, e fotografias dos equipamentos e procedimentos realizados. Estes dados serão então redigidos sob a forma de um relatório, para que possam ser utilizados na pesquisa metodológica.

4.5 Duração do estudo

O estudo terá duração total de 5 meses, sendo que a coleta de dados se dará durante os 4 meses de trabalho no Laboratório Ampère. No último mês, será finalizado o trabalho escrito, com as conclusões e a proposição de sugestões.

5. RESULTADOS

Durante o estágio realizado no Laboratório Ampère, pôde-se verificar uma metodologia genérica aplicada aos estudos de diversidade microbiana com utilização de microchips filogenéticos. De maneira simplificada, essa metodologia consiste em extrair o DNA metagenômico do solo, amplificar a região do gene 16S por PCR, efetuar uma transcrição que resultará em fragmentos de RNA, marcar as moléculas de RNA com cianina 3 (Cy3), hibridizar esse RNA em um microchip contendo seqüências de oligonucleotídeos conhecidas, escanear o microchip para obtenção da imagem de hibridização, e tratar estatisticamente os dados, para identificar as bactérias presentes no solo. A Figura 17 representa de maneira esquemática tal metodologia, que permite analisar a diversidade de comunidades bacterianas de uma amostra e compará-la com outras comunidades de amostras provenientes de outros locais. Cada uma dessas etapas será descrita, detalhada e discutida nos itens a seguir.

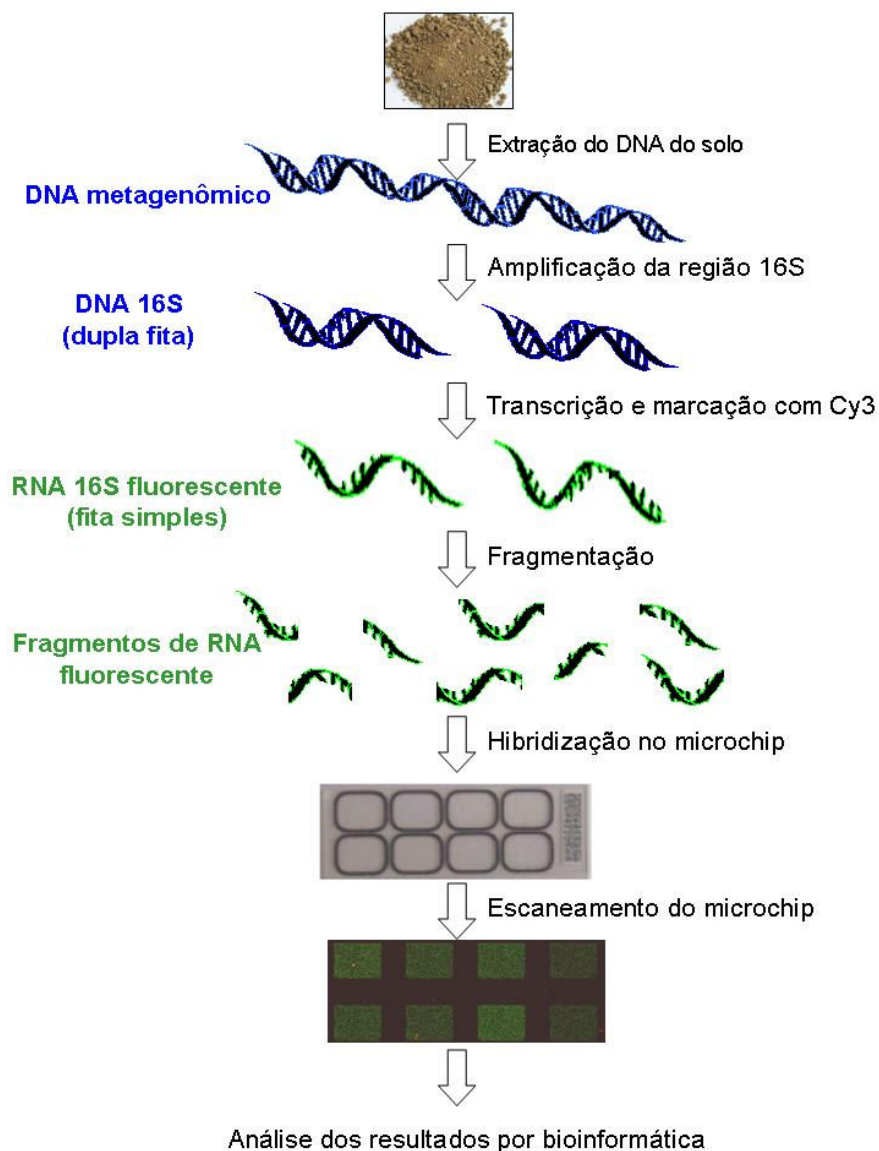


Figura 17 – Esquema do procedimento experimental utilizado para a caracterização das populações bacterianas presentes no solo, através da utilização de microchips filogenéticos.

5.1 Extração do DNA da amostra de solo

A etapa inicial dos experimentos que utilizam microchips filogenéticos é a extração do DNA metagenômico presente na amostra de solo a ser estudada. Atualmente, existem diversos kits desenvolvidos para esta finalidade, de diferentes marcas e laboratórios. Sempre que possível, deve-se testar dois ou três kits diferentes em uma amostra de solo de um determinado local de estudo e comparar suas eficiências, ou seja, a concentração de DNA obtida após extração. Isso se deve ao fato de os kits possuírem reagentes diferentes que podem se adaptar melhor a solos argilosos, arenosos, etc. Assim, dependendo do tipo de solo, determinado kit terá melhor desempenho e será o adotado para as demais amostras desse local de estudo.

No Laboratório Ampère, o kit mais frequentemente utilizado é o UltraCleanTM Soil DNA Isolation Kit, da empresa MO BIO Laboratories, Inc. Esse kit permite o isolamento do DNA metagenômico contido numa amostra de solo de 0,25g a 1,0g, graças a uma combinação de agentes químicos e mecânicos que possibilitam a lise das células e a extração do DNA.

Feita a escolha do kit de extração, deve-se seguir rigorosamente o protocolo recomendado pelo fabricante. De maneira geral, a extração é realizada em condições estéreis, para evitar contaminações com DNA estranho, e segue cinco etapas.

→ Etapas 1: lise celular

A extração de DNA de amostras de solo inicia-se pela lise das células presentes no mesmo. Para isso, a amostra de solo é inserida em um tubo, contendo grãos de diversos tamanhos e uma solução responsável pela dissolução dos ácidos húmicos (*bead solution tubes*).

Além disso, é constante a presença do dodecil sulfato de sódio (SDS), um detergente aniônico que ajuda na lise das células, através da quebra dos ácidos graxos e lipídios que formam a membrana celular.

Quando o DNA extraído será posteriormente utilizado numa PCR (caso dos microchips) é importante a adição de uma Solução de Remoção de Inibidores (IRS), de composição própria de cada fabricante, que tem a função de precipitar ácidos húmicos e outros inibidores da PCR.

Os tubos contendo a amostra de solo, os grãos e soluções acima descritas são sacudidos vigorosamente em posição horizontal, por um aparelho destinado a este fim, por pelo menos 10 minutos. A colisão entre os grãos e as células bacterianas provoca a lise mecânica, que combinada com o efeito dos reagentes químicos, proporciona uma eficiente quebra das células microbianas e a liberação do DNA no meio extracelular.

→ Etapas 2: precipitação das partículas

Após a lise, os tubos passam por uma centrifugação, onde os restos celulares, solo, grãos e ácidos húmicos decantam. Nesta etapa, o DNA se encontra dissolvido no líquido sobrenadante, que será transferido para um tubo plástico de 1,5mL.

Em seguida, adiciona-se um reagente para a precipitação de proteínas. Essa etapa é importante, pois remove proteínas contaminantes que podem causar a redução do grau de pureza do DNA e inibir aplicações posteriores do mesmo.

Após uma centrifugação, o líquido é transferido a um novo tubo plástico de 1,5mL, evitando-se o material decantado.

→ Etapa 3: fixação do DNA em membrana de sílica

O passo seguinte consiste na adição de uma solução salina que é responsável pela fixação do DNA em sílica. O DNA fixa-se em material silicoso na presença de altas concentrações de sal. Essa mistura (DNA + solução salina) é, então, transferida para um microfiltro de membrana de sílica, que é parte integrante dos kits. O que ocorre é que o DNA é seletivamente fixo na membrana de sílica do microfiltro. Praticamente todos os contaminantes passam pela membrana do filtro, deixando apenas o DNA desejado para trás.

→ Etapa 4: Lavagem da membrana

Utiliza-se uma solução contendo etanol para se efetuar uma lavagem mais profunda da membrana do microfiltro. Essa solução de lavagem remove resíduos de sal, ácidos húmicos e outros contaminantes, sem, porém, desfixar o DNA da membrana.

→ Etapa 5: Eluição

A última etapa consiste na eluição do DNA fixado na membrana. Para isso, adiciona-se uma solução-tampão estéril no centro da membrana do microfiltro. Procede-se uma centrifugação e quando a solução passa pela membrana, o DNA é liberado e atravessa a membrana podendo ser recolhido no fundo do tubo. O DNA é liberado porque ele apenas se fixa na sílica na presença de sal.

A solução contendo o DNA do solo se encontrará no fundo do tubo e está pronta para futuras utilizações. É recomendado que o DNA extraído seja armazenado congelado a -20°C.

A Figura 18 apresenta um esquema de extração do DNA, através da utilização do kit UltraCleanTM Soil DNA Isolation. O protocolo de extração fornecido pelo fabricante consta no Anexo I.

A Figura 19 ilustra os componentes do kit: soluções reagentes, *bead tubes*, microfiltro de membrana de sílica e tubos de 1,5mL.

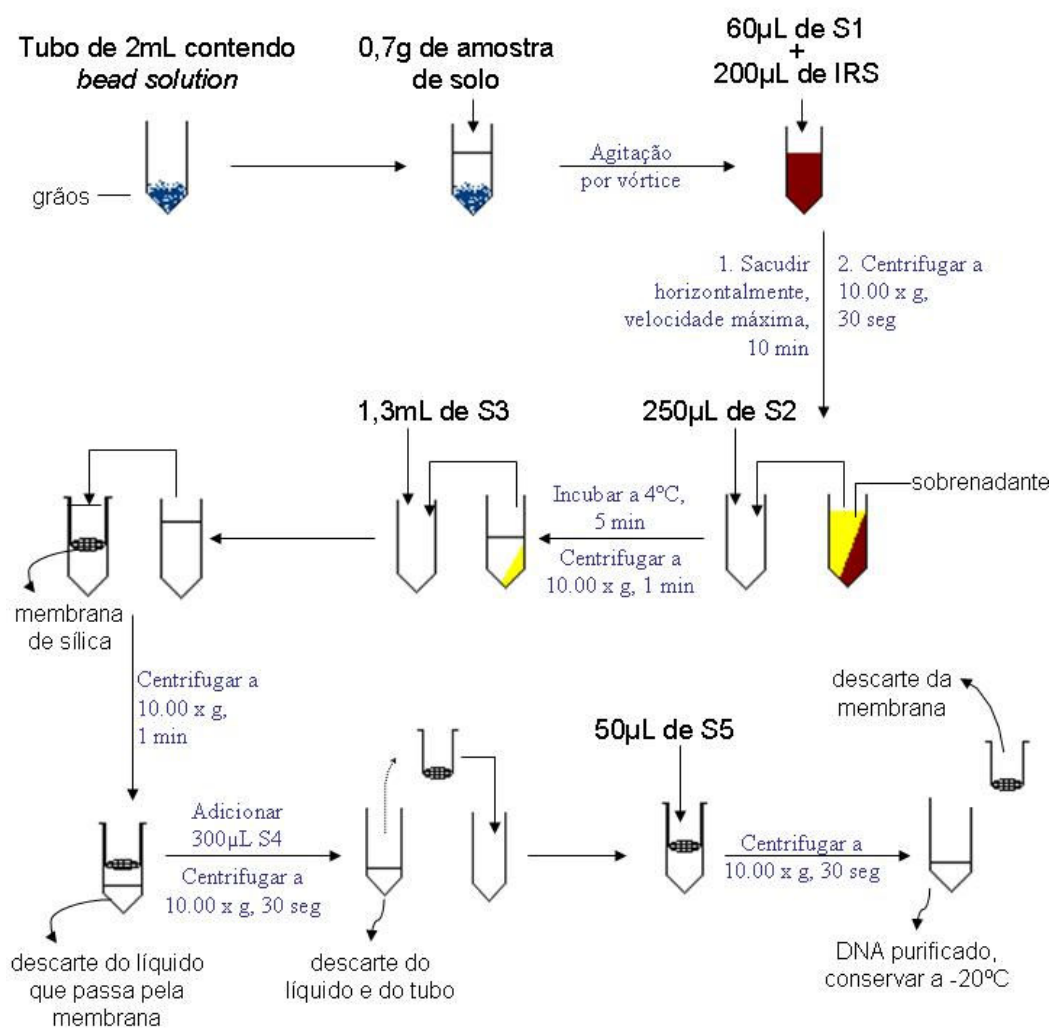


Figura 18 – Esquema do protocolo de extração de DNA do solo pelo kit UltraClean™ Soil DNA Isolation.



Figura 19 – Componentes do kit UltraClean™ Soil DNA Isolation.

5.2 Quantificação do DNA extraído

Feita a extração do DNA metagenômico do solo, é desejável saber a concentração de DNA final obtida, para se verificar a eficiência da etapa anterior.

A quantificação do DNA pode ser feita através da utilização do espectrofotômetro, equipamento que permite comparar a radiação absorvida ou transmitida por uma solução que contém uma quantidade desconhecida de soluto, e uma quantidade conhecida da mesma substância. A absorção das radiações depende das estruturas das moléculas, e é característica para cada substância química.

Para quantificar o DNA utiliza-se o comprimento de onda de 260nm. Primeiramente deve-se fazer a calibração do aparelho com o branco (cubeta contendo apenas água destilada). Em seguida, dilui-se a solução de DNA em água destilada e mede-se a absorbância à 260nm.

Sabendo que 1 unidade de absorbância à 260nm corresponde a uma concentração de 50ng de DNA dupla-fita por microlitro, o resultado dado pelo espectrofotômetro permite calcular a concentração de DNA na amostra pela seguinte relação:

$$C_{\text{DNA}} = A_{260} \times \text{fator de diluição} \times 50\text{ng}/\mu\text{L}$$

Na quantificação de DNA utiliza-se geralmente pequenas cubetas, uma vez que não se tem grandes volumes de DNA. Assim, utiliza-se freqüentemente o volume de 100 μL para leitura. A diluição dependerá da concentração da amostra, sendo comum a utilização de fator de diluição 10, 20 ou 50 vezes. A Tabela 2 indica os volumes de água e amostra para os diferentes fatores de diluição.

Tabela 2 – Diluições utilizadas para a quantificação de DNA por espectrofotometria.

Diluição	10x	20x	50x
Volume de água destilada	90 μL	95 μL	98 μL
Volume de DNA	10 μL	5 μL	2 μL
Volume total	100 μL	100 μL	100 μL

Outro método que pode ser utilizado, principalmente quando a concentração de ácidos nucleicos é baixa, é a plataforma QubitTM do Laboratório Invitrogen, que permite dosar o DNA através do método fluorométrico.

Nesse caso, adiciona-se ao DNA um fluoróforo que se torna fluorescente quando fixado especificamente a moléculas de DNA de dupla-fita. Após um curto tempo de incubação em temperatura ambiente, a fluorescência é medida diretamente pelo aparelho QubitTM. A especificidade do fluoróforo proporciona maior acurácia nos resultados do que a absorbância de raios UV porque a fluorescência está ligada apenas à molécula de interesse (DNA no caso) e não a contaminantes presentes. A Figura 20 ilustra o equipamento QubitTM.

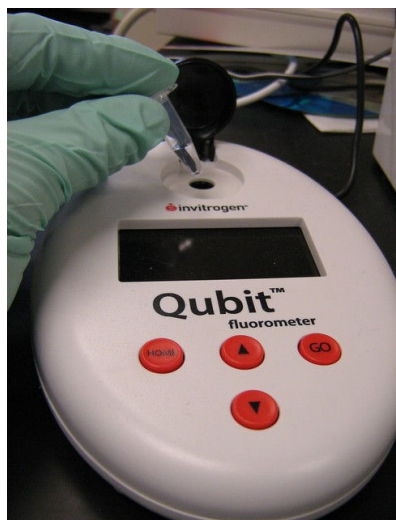


Figura 20 – Aparelho Qubit™, utilizado para a quantificação fluorométrica de DNA.

A concentração de DNA obtida após a extração varia muito conforme o tipo de solo da amostra. Durante o estágio realizado no Laboratório Ampère, verificou-se, por exemplo, que a extração do DNA de um solo de um ambiente extremo (rico em zinco) resultou em concentrações na faixa de 10µg/mL, enquanto a faixa de concentração para a rizosfera de um solo agrícola chega a 70µg/mL.

5.3 Amplificação do gene 16S por PCR

Como discutido na revisão bibliográfica, a região 16S do DNA bacteriano consiste na sequência de cerca de 1.500 nucleotídeos que codifica para a subunidade menor dos ribossomos e apresenta alto grau de conservação, sendo, portanto, utilizada para estudos de diversidade.

A PCR tem por objetivo amplificar essa sequência, a fim de se obter quantidades suficientes para dar prosseguimento aos estudos. A reação consiste numa sucessão de ciclos constituídos de três etapas – desnaturação, anelamento e extensão – que se processam em temperaturas diferentes.

Para realizar a PCR deve-se preparar um mix contendo todos os componentes necessários para a reação: *primers*, que selecionam a área da fita de DNA que será amplificada; desoxirribonucleotídeos (dNTPs), com as bases nitrogenadas adenina (dATP), guanina (dGTP), citosina (dCTP) e timina (dTTP), para a composição das novas cópias de DNA sintetizadas; enzima Taq polimerase, responsável pela extensão do fragmento de DNA. Além disso, adiciona-se água e uma solução-tampão. Por último, tem-se o DNA *template*, ou seja, o DNA molde que se deseja amplificar.

Para a amplificação de uma zona específica do DNA por PCR deve-se utilizar *primers* específicos a esta zona. Deve existir somente um sítio de pareamento no DNA molde onde ocorra a ligação do *primer*, o que significa que a sequência dos

primers é única na sequência do DNA molde. No caso do gene 16S, os *primers* utilizados são o pA (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') e o pH (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3'), que são considerados *primers* universais para as bactérias.

Na utilização dos microchips, uma etapa que segue a PCR é a transcrição (síntese de RNA a partir do DNA). Para que essa etapa ocorra de maneira adequada faz-se uso de um artifício: em um dos *primers*, o pH, é acoplado um promotor de transcrição. Esse promotor, chamado T7, cuja sequência é 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3', corresponde a uma sequência que permitirá posteriormente a fixação da T7 RNA polimerase em uma das fitas do DNA para que ocorra a transcrição.

A Tabela 3 traz a composição do mix de PCR para 16S utilizado no Laboratório Ampère, para uma amostra.

Tabela 3 – Mix de PCR, para 1 reação.

Reagente	Concentração comercial	Volume utilizado por reação (µL)	Concentração final
Água ultra-pura	-	39,0	-
Solução-tampão	10 X	5,0	1X
pA	10 µM	1,0	0,2 µM
pH-T7	10 µM	1,0	0,2 µM
dNTP	10 mM	1,0	0,2 mM
Taq polimerase	50 X	1,0	1X
DNA molde	-	2,0	-
Volume total	-	50	-

Geralmente, faz-se uma PCR para diversas amostras ao mesmo tempo. Nesses casos, prepara-se o mix de PCR (sem adição do DNA, que é próprio de cada amostra) multiplicando-se o volume de cada reagente pelo número de amostras, e adiciona-se um pequeno percentual para compensar erros de pipetagem. Assim, quando se tem 2 amostras, multiplica-se o volume de reagentes por 2,5; no caso de 4 amostras, multiplica-se por 4,5 e assim por diante. A Tabela 4 traz os volumes de reagentes utilizados para um número “x” de amostras.

Tabela 4 – Volume de reagentes, em µL, utilizados para a preparação do mix de PCR, para x reações.

Reagente	x=1	x=2	x=4	x=6	x=8	x=10	x=12	x=14	x=16	x=20
Água ultra-pura	39,0	97,5	175,5	253,5	331,5	409,5	487,5	585,0	663,0	819,0
Solução-tampão	5,0	12,5	22,5	32,5	42,5	52,5	62,5	75,0	85,0	105,0
pA	1,0	2,5	4,5	6,5	8,5	10,5	12,5	15,0	17,0	21,0
pH-T7	1,0	2,5	4,5	6,5	8,5	10,5	12,5	15,0	17,0	21,0
dNTP	1,0	2,5	4,5	6,5	8,5	10,5	12,5	15,0	17,0	21,0
DNA polimerase	1,0	2,5	4,5	6,5	8,5	10,5	12,5	15,0	17,0	21,0

Para evitar possíveis contaminações, essa preparação deve ser feita numa capela especial, previamente irradiada com raios UV, para se diminuir os riscos de contaminação com DNA estranho à amostra. Além disso, é aconselhável que todos os tubos, ponteiros de pipeta, água e solução-tampão fiquem expostos aos raios UV por pelo menos 15 minutos.

A preparação é feita adicionando-se os reagentes em um tubo plástico de 1,5 mL, com exceção do DNA molde. Inicia-se pelo reagente de maior volume (água) e segue-se em ordem decrescente. A enzima Taq polimerase deve ser colocada somente ao final, por ser extremamente reativa.


Após a preparação do mix, distribui-se o mesmo (48µL) em pequenas cubetas plásticas compatíveis com o termociclador e adiciona-se o DNA previamente extraído das amostras ambientais (2µL). A adição do DNA é feita fora da capela, pois procura-se manter tal capela livre de contaminação de DNA.

Além disso, é comum a utilização da testemunha negativa, ou seja, uma cubeta que não contém DNA, mas apenas o mix de PCR. Ela servirá para comprovar a ausência de contaminação do mix com DNA estranho a amostra. Assim, após a PCR não poderá ser constatada nenhuma sequência de DNA na testemunha negativa. Caso a mesma esteja presente, deve-se recomençar a PCR.

Os tubos são então colocados no termociclador que se encarregará de manter a temperatura adequada, pelo tempo necessário, para cada etapa do processo de PCR (desnaturação, anelamento, extensão). O programa utilizado no Laboratório Ampère para a amplificação do gene 16S, segue a sequência indicada pela Tabela 5. São 35 ciclos de desnaturação – anelamento – extensão, precedidos da desnaturação inicial e sucedidos da extensão final.

Tabela 5 –Programa do termociclador para a realização de uma PCR 16S.

Etapa	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	94°C	3 minutos
Desnaturação	94°C	45 segundos
Anelamento	55°C	45 segundos
Extensão	72°C	90 segundos
Extensão final	72°C	5 minutos



x 35 ciclos

A Tabela 6 traz os nomes comerciais e marcas dos reagentes utilizados no Laboratório Ampère para a realização da PCR 16S.

Tabela 6 – Reagentes utilizados para PCR 16S no Laboratório Ampère.

Reagente	Nome comercial	Laboratório
DNA polimerase	TITANIUM™ Taq DNA Polimerase	Clontech
Solução-tampão	TITANIUM™ PCR Buffer	Clontech
dNTP	PCR Nucleotide Mix	Roche
pA	Sob encomenda pela sequência	Invitrogen
pH-T7	Sob encomenda pela sequência	Invitrogen

A Tabela 7 traz as características técnicas do termociclador utilizado no Laboratório Ampère.

Tabela 7 – Especificações técnicas do termociclador utilizado no Laboratório Ampère.

Aparelho	BIOMETRA T1 THERMOCYCLER
Formato do bloco	96 espaços (12x8)
Tipo do bloco	High Speed Silver Block
Aquecimento máximo	4,0 °C/seg
Resfriamento máximo	3,0 °C/seg
Uniformidade da temperatura	+/- 0,3 °C
Faixa de temperatura	-3 °C a 99 °C
Acurácia de controle	+/- 0,1 °C

5.4 Isolamento do gene 16S por eletroforese

Tendo a PCR amplificado um gene específico, faz-se necessária a verificação e identificação dos produtos da reação. Para isso, utiliza-se a técnica de eletroforese em gel de agarose combinada com a utilização de um corante de intercalação (geralmente o brometo de etídio) e raios UV.

A eletroforese torna possível estimar o comprimento (número de pares de bases) dos produtos da PCR e a esse comprimento frequentemente serve para a identificação dos produtos.

Os ensaios de eletroforese partem do princípio que determina que a carga global de uma fita de DNA é negativa e, assim, ele migra do cátodo ao ânodo, quando exposta a uma voltagem. Portanto, uma solução que possua íons livres e que tenha moléculas de DNA em suspensão pode ser purificada aplicando-se uma dada voltagem.

Ao final do processo, as cadeias de DNA estarão próximas ao cátodo (pólo positivo). No entanto, o foco da técnica é separar os fragmentos de DNA por tamanho, uma vez que a PCR gera fragmentos de mesma extensão. Assim, faz-se um “peneiramento” do resultado da PCR.

Os fragmentos de DNA são empurrados através do gel de agarose pela corrente elétrica. Utiliza-se o princípio de que cadeias maiores demoram mais tempo para passar pelos poros do gel e cadeias menores viajam mais rapidamente através dele.

São utilizadas concentrações de 0,5 a 3% de agarose no gel. Quanto maior a concentração, maior a sua capacidade de distinguir fragmentos de tamanhos próximos. Por exemplo, um gel de agarose a 1% pode separar fragmentos com uma diferença de tamanho de 80 pares de bases, enquanto que a 2,5% pode-se separar fragmentos com diferença de no mínimo 30 pares de bases.

A distância que o fragmento percorreu a partir do ponto de aplicação no gel é comparada com a distância que outros fragmentos de tamanhos conhecidos percorreram no mesmo gel. Esses fragmentos são os marcadores de tamanho molecular, conhecidos como *ladders*, que se constituem de misturas de trechos de DNA com tamanhos variáveis, normalmente equidistantes entre si.

O procedimento se inicia com a preparação do gel de agarose 0,8% (relação peso/volume), como indicado na Tabela 8.

Tabela 8 – Composição do gel de agarose a 0,8%.

Reagente	Quantidade
Agarose em pó	0,8 g
Tri-Borato EDTA (0,5X)	100 mL
Brometo de etídeo (10mg/mL)	2 µL

Os dois primeiros componentes do gel são misturados e aquecidos por cerca de 1 minuto em forno microondas. Após a completa dissolução da agarose, adiciona-se o brometo de etídeo (BET), que terá concentração final de 0,2 µg/mL.

A agarose é um polissacarídeo em forma de pó, que quando suspenso em solução aquosa e aquecido, dissolve-se completamente, solidificando-se lentamente quando a temperatura cai. Enquanto está na forma líquida, será colocada num molde que lhe dará o formato de um bloco quando resfriar. Numa das extremidades, antes da solidificação, é acoplado um pente, que deixará pequenos furos (poços) no gel.

O Tri-Borato EDTA (TBE) é uma solução-tampão eletrolítica, que também é utilizada para recobrir o gel na cuba de eletroforese e possibilita a passagem de corrente elétrica.

O BET tem a função de se intercalar em duplas hélices de DNA e apresenta fluorescência laranja quando exposto à iluminação UV, possibilitando a visualização das sequências de DNA amplificadas pela PCR. É um composto químico com potencial carcinogênico e deve, portanto, ser utilizado com precaução (luva, óculos e jaleco complementar).

Após o resfriamento do gel, o pente é retirado e em seu lugar ficam espaços cujo volume varia de acordo com o volume de agarose e o sistema de montagem utilizado. O bloco de agarose é então colocado na cuba de eletroforese, ficando recoberto pelo tampão TBE.

Aos produtos da PCR é adicionado um corante azul (*loading dye*), que tem como função aumentar a viscosidade da amostra e assim impedir que esta flutue na solução-tampão que recobre a cuba. Além disso, a utilização do corante permite a visualização do andamento da corrida.

Além dos produtos de PCR, adiciona-se em um dos poços o marcador de tamanho molecular. O marcador utilizado no Laboratório Ampère para detectar os produtos de uma PCR 16S é o GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder. A imagem 21 ilustra a escala desse marcador.

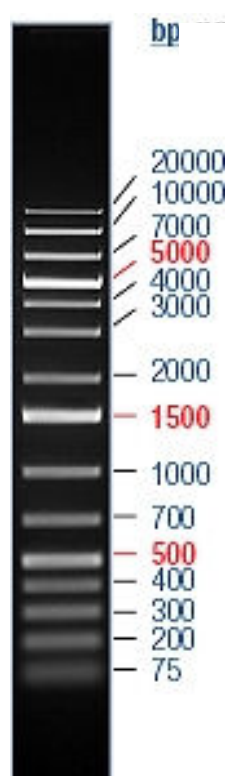


Figura 21 – GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, utilizado para a identificação de bandas 16S, após PCR.

Depositas as amostras nos poços (cerca de 30 μ L), estabelece-se a voltagem entre as extremidades do gel, sendo comum a utilização de 100V durante 30 minutos.

A Figura 22 ilustra uma montagem da cuba de eletroforese

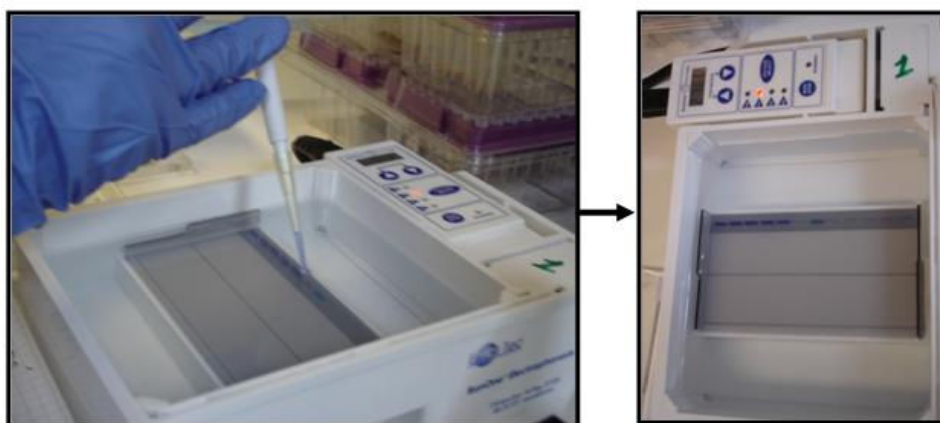


Figura 22 – Montagem de uma cuba de eletroforese em gel de agarose.

A visualização dos produtos no gel, após a corrida, se dá pela ligação entre o DNA e o brometo de etídeo. Esse composto tem a capacidade de se inserir nas fendas da cadeia de DNA e apresenta fluorescência quando excitado com radiação ultravioleta.

Deve-se tomar cuidados especiais durante a visualização sob raios UV, uma vez que os mesmos representam perigo para a pele e olhos, sendo imperativa a utilização de máscara própria para esse procedimento.

Quando a PCR é bem sucedida, obtém-se uma banda de gene 16S bem definida, como mostrada na Figura 23 (eletroforese realizada sobre 9 amostras e uma testemunha negativa). Essa banda será recortada com auxílio de uma lâmina e o passo seguinte consistirá na purificação do DNA contido no gel.

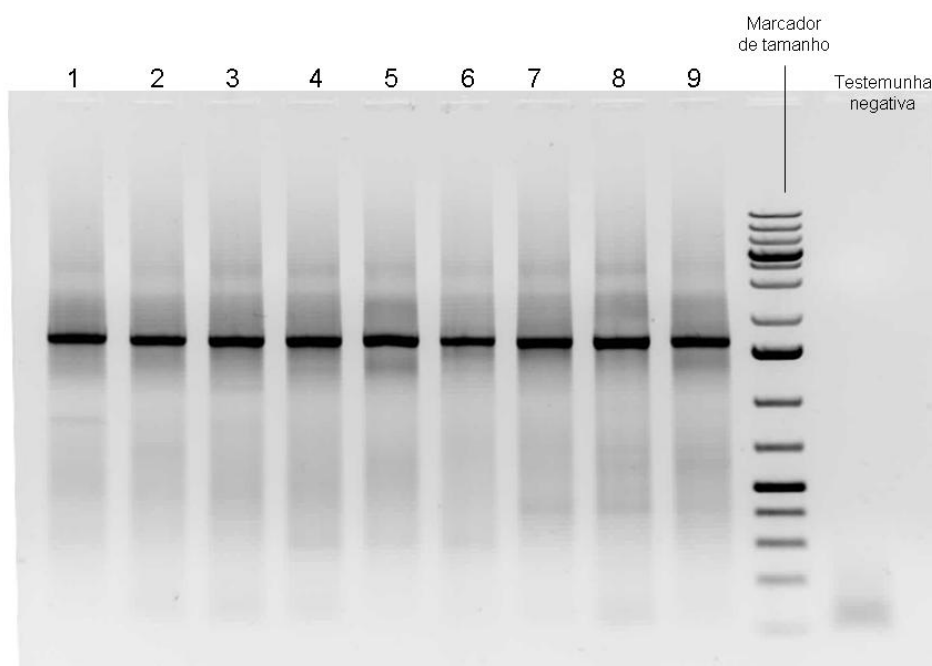


Figura 23 – Bandas do gene 16S, obtidas de 9 amostras, após eletroforese em gel de agarose.

A Figura 24 resume a etapa de eletroforese.

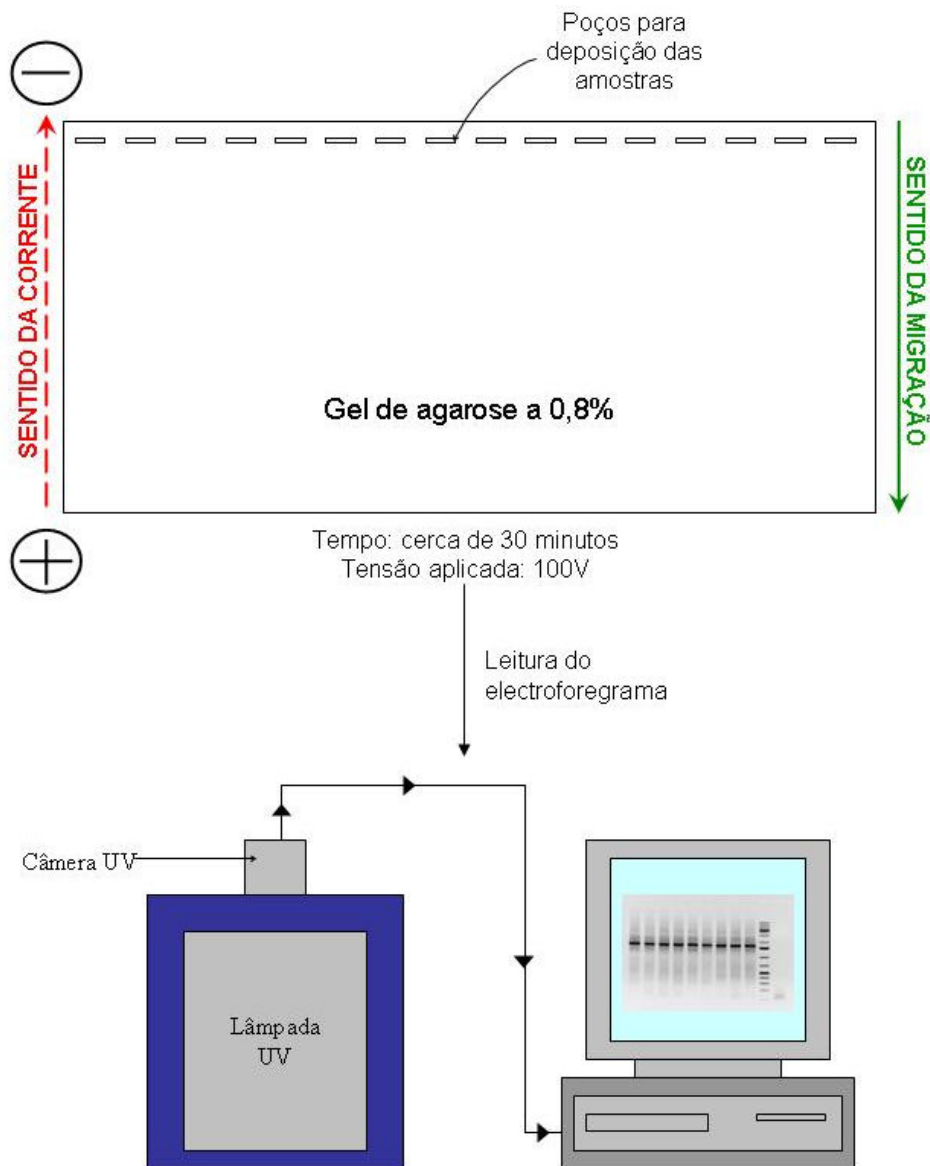


Figura 24 – Esquema do procedimento de eletroforese em gel.

5.5 Purificação do gene 16S contido no gel

O objetivo da purificação é eliminar o máximo de impurezas, perdendo o mínimo possível do DNA de interesse. A purificação é feita através da utilização de kits comerciais, geralmente baseados em colunas de sílica.

O kit utilizado com maior frequência no Laboratório Ampère é o NucleoSpin^R Extract II, do Laboratório Macherey-Nagel, que permite a purificação rápida de fragmentos de DNA (tamanho entre 65 e 5.000 pares de bases) contidos em gel de agarose TBE, com recuperação média de 75 a 90% da quantidade de DNA.

O princípio básico do método é a ligação do DNA a uma membrana de sílica na presença de uma solução-tampão salina, denominada NT. A mistura entre o DNA e o NT é disposta sobre a coluna de sílica. Os contaminantes como sais e componentes solúveis de macromoléculas serão removidos através da lavagem da membrana com uma solução de etanol (NT3). Por fim, o DNA purificado é eluído em condições de baixa concentração de íons, através da utilização de uma solução levemente alcalina (NE).

Deve-se seguir o protocolo recomendado pelo fabricante (Anexo II), que basicamente consiste em 5 etapas, que se assemelham àquelas utilizadas para a extração do DNA do solo.

→ Etapa 1: Lise do gel

O procedimento se inicia pelo recorte cuidadoso da banda 16S do gel, buscando-se minimizar o volume de gel, e colocando-a em um tubo plástico de 1,5mL.

Em seguida, o pedaço de gel será liquefeito com a adição de um tampão de captura, denominado NT, e incubação a 50°C por cerca de 10 minutos.

→ Etapa 2: fixação do DNA em membrana de sílica

Após a completa dissolução do gel, a amostra será colocada na coluna de sílica e centrifugada por 1 minuto a 11.000 x g. Isso permitirá a passagem dos líquidos (tampão e gel dissolvido) pela membrana, mas o DNA ficará fixo à mesma.

→ Etapa 3: Lavagem da membrana

Nesta etapa, adiciona-se uma solução de lavagem (NT3), contendo etanol, à membrana, para a eliminação de contaminantes. A amostra deve ser centrifugada por 1 minuto a 11.00 x g.

→ Etapa 4: Secagem da membrana

Realiza-se uma centrifugação adicional (2 minutos a 11.000 x g) dos tubos contendo a membrana com o intuito de remover quaisquer resíduos de etanol que possam estar presentes, uma vez que o mesmo pode inibir aplicações subseqüentes do DNA.

→ Etapa 5: Eluição

As colunas de sílica são dispostas em tubos limpos de 1,5mL e adiciona-se 50µL da solução de eluição (NE). Após 1 minuto de incubação em temperatura ambiente, centrifuga-se o tubo contendo a coluna de sílica por 1 minuto a 11.000 x g e o DNA purificado será recolhido no fundo do tubo.

A Figura 25 apresenta de forma esquemática o processo de purificação do DNA 16S do gel de agarose.

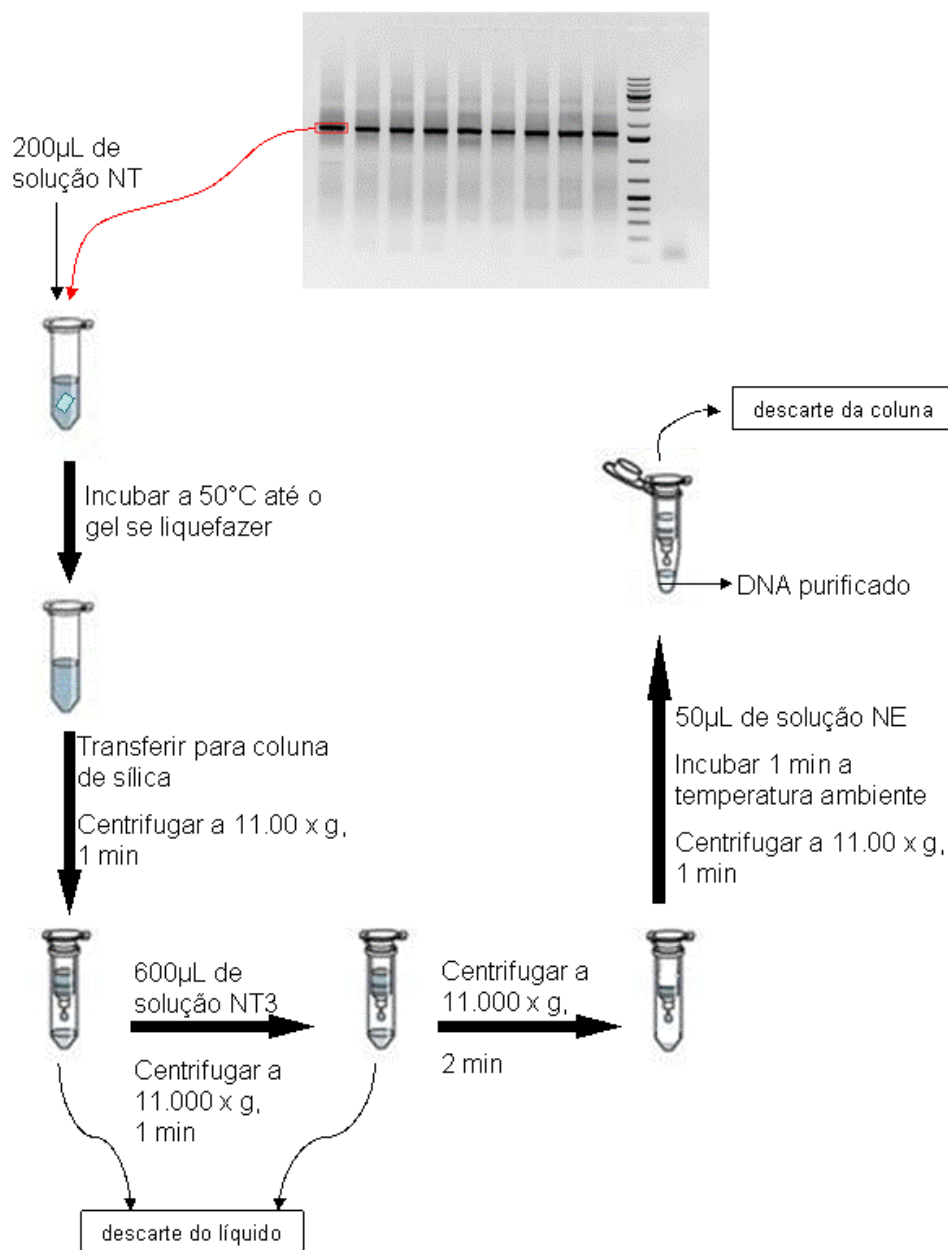


Figura 25 – Esquema do procedimento de purificação do DNA contido no gel de agarose.

Após esse processo, procede-se a quantificação do DNA purificado, através de espectrofotometria, como descrito no item 5.2. A faixa de concentração de DNA varia conforme o tipo de amostra e o kit utilizado. Nas análises desenvolvidas no Laboratório Ampère, após a etapa de purificação, a concentração de DNA encontrava-se na faixa entre 5,0 e 20,0 µg/mL.

5.6 Transcrição e marcação com Cy3

Após a purificação, obtém-se uma solução de DNA dupla-hélice com tamanho da ordem de 1.500 pares de bases. A partir dessa solução de DNA, deseja-se obter o RNA correspondente marcado por uma substância que permita sua visualização. Para isso, durante o processo de transcrição *in vitro*, utiliza-se um nucleotídeo acoplado a um fluoróforo, a cianina 3 (Cy3).

Assim, a transcrição e marcação do RNA ocorrem ao mesmo tempo. Para isso, deve-se preparar um mix contendo todos os reagentes necessários, como indicado na Tabela 9.

Tabela 9 – Mix de transcrição e marcação do RNA, para 1 reação.

Reagente	Concentração comercial	Volume utilizado por reação (μL)	Concentração final
Solução-tampão	5 X	4,0	1 X
DTT	100 mM	2,0	10 mM
ATP	10 mM	1,0	0,5 mM
CTP	10 mM	1,0	0,5 mM
GTP	10 mM	1,0	0,5 mM
UTP	10 mM	0,5	0,25 mM
RNasin	40 U/μL	0,5	2,5 U/μL
RNA polimerase	50 U/μL	1,0	0,25 U/μL
UTP-Cy3	5 mM	1,0	0,25 mM
DNA purificado	-	8,0	-
Volume total	-	20,0	-

A Tabela 9 indica que uma parte dos nucleotídeos de uracila (UTP) são substituídos por nucleotídeos acoplados à Cy3 (UTP-Cy3). A Cy3 é um composto fluorescente que pode ser acoplado a nucleotídeos, e que depois de incorporado às moléculas de RNA, torna-as fluorescentes, o que permitirá posteriormente revelar os fragmentos de RNA hibridizados ao microchip. A Cy3 pode ser dosada por espectrofotometria, com absorbância ao comprimento de onda de 550nm. A olho nu, a cianina 3 possui coloração rosa.

O DTT (dithioreitol) é um reagente que age na desnaturação da cadeia molde de DNA, quebrando as pontes de hidrogênio entre as bases.

Já a RNasin tem a função de inibir a ação de RNases, que são enzimas responsáveis pela degradação do RNA. Estas enzimas catalisam a hidrólise de moléculas de RNA, ou seja, as quebram em diminutos pedaços, e fazem com que uma amostra de RNA seja bem instável em um ambiente desprotegido. As RNases são praticamente onipresentes e são encontradas na pele, cabelos, unhas, saliva. Assim ao se manipular amostras de RNA deve-se ter uma série de cuidados, como a utilização de luvas e tubos e ponteiros de pipeta *RNases Free*. Além disso, a bancada de trabalho deve ser limpa com produto especial para eliminação de RNases.

Os nucleotídeos trifosfatados (ATP, CTP, GTP e UTP) constituem-se na base para a molécula de RNA a ser sintetizada e a RNA polimerase é a enzima responsável por essa síntese.

A cianina 3 é um composto foto-sensível e por isso deve ser o último reagente adicionado ao mix. A partir desse ponto, deve-se evitar a exposição da preparação contendo Cy3 à luz o máximo possível até o fim dos experimentos com microchips. Para isso, mantêm-se as preparações embrulhadas em papel alumínio, sempre que possível.

Da mesma forma que para a reação de PCR, deve-se preparar o mix para a transcrição de diversas amostras levando-se em consideração um pequeno percentual de sobra, para compensar erros de pipetagem. Assim, para 2 amostras, multiplica-se os volumes de reagentes por 2,5; para 4 amostras, multiplica-se por 4,5 e assim por diante.

Após a preparação do mix, distribui-se 12 µL do mesmo a tubos contendo 8µL de DNA 16S purificado. Esses tubos serão então incubados por 4 horas a 37°C, no escuro (cubrir com papel alumínio). É importante que o tempo de incubação não ultrapasse 4 horas, pois após esse tempo existe a possibilidade de degradação do RNA.

A Tabela 10 traz os nomes comerciais e marcas dos reagentes utilizados no Laboratório Ampère para a realização da transcrição.

Tabela 10 – Reagentes utilizados para a transcrição no Laboratório Ampère.

Reagente	Nome comercial	Laboratório
RNA polimerase	T7 RNA Polymerase	Invitrogen
Solução-tampão	T7 RNA Buffer	Invitrogen
DTT	DTT	Invitrogen
NTP	NTP-set	Serva
RNasin	RNasin ^R Plus Exp5/10	Promega
UTP-Cy3	Amersham Cy3-UTP	GE Healthcare

Terminada a incubação, têm-se tubos contendo os RNAs sintetizados, mas também restos dos reagentes da transcrição (DNA, nucleotídeos não utilizados, enzima, etc.), necessitando de uma etapa de purificação.

5.7 Purificação do RNA

A purificação do RNA sintetizado pela transcrição *in vitro* apresenta procedimento bastante semelhante àquele utilizado para a purificação do DNA. Neste caso também, utilizam-se kits comerciais que se baseiam na fixação do RNA em uma coluna.

O kit utilizado no Laboratório Ampère para essa finalidade é o RNeasy Mini Kit, da Quiagen. O protocolo de purificação consta no Anexo III e consiste em basicamente 3 etapas.

→ Etapas 1: fixação do RNA na coluna

Inicialmente deve-se ajustar o volume das amostras para 100µL, através da adição de 80µL de água destilada (já que o volume total de transcrição era de 20µL). Em seguida, adiciona-se 350µL da solução-tampão RLT e 250µL de etanol 100%, homogeneizando a mistura com o auxílio da pipeta.

A mistura RNA-RLT-etanol é então transferida para uma coluna (componente do kit) que está posicionada sobre um tubo plástico de coleta de 2 mL. Essa montagem será centrifugada por 15 segundos a 10.000 r.p.m. e durante esse processo o RNA precipitará e ficará retido na membrana, enquanto o líquido que passa pela coluna será descartado.

→ Etapas 2: Lavagem do RNA

A lavagem da coluna é feita pela adição de 500µL da solução RPE sobre a coluna, seguida da centrifugação por 15 segundos a 10.000 r.p.m. Esse processo é repetido duas vezes e o líquido que atravessa a membrana é descartado.

Para garantir uma boa secagem da coluna, realiza-se uma centrifugação da mesma durante 1 minuto a 13.000 r.p.m. Esta etapa é muito importante, pois elimina traços de sal e etanol contidos nas soluções aplicadas anteriormente que podem afetar as reações posteriores.

→ Etapas 3: Eluição do RNA

Para a eluição do RNA fixado, deve-se colocar a coluna em um tubo limpo de 1,5mL e adicionar 40µL de água ultra-pura, bem ao centro da membrana. Após incubação de 1 minuto em temperatura ambiente, centrifuga-se a amostra durante 1 minuto a 10.000 r.p.m. e tem-se o RNA purificado no fundo do tubo.

Deve-se armazenar o RNA obtido após essa etapa a temperatura de -20°C e ao abrigo da luz, para evitar a degradação da Cy3.

A quantificação da concentração de RNA obtido e da eficiência na marcação dessas moléculas é feita por espectrofotometria. Mede-se a absorbância a 260nm (para a concentração de RNA) e 550nm (para a frequência de incorporação do marcador). A partir desses dados, utiliza-se um software online que calcula a concentração de RNA e a eficiência da marcação. O software pode ser encontrado no endereço <www.ambion.com/techlib/append/base_dye.html>.

A Figura 26 esquematiza os procedimentos efetuados durante a etapa de transcrição.

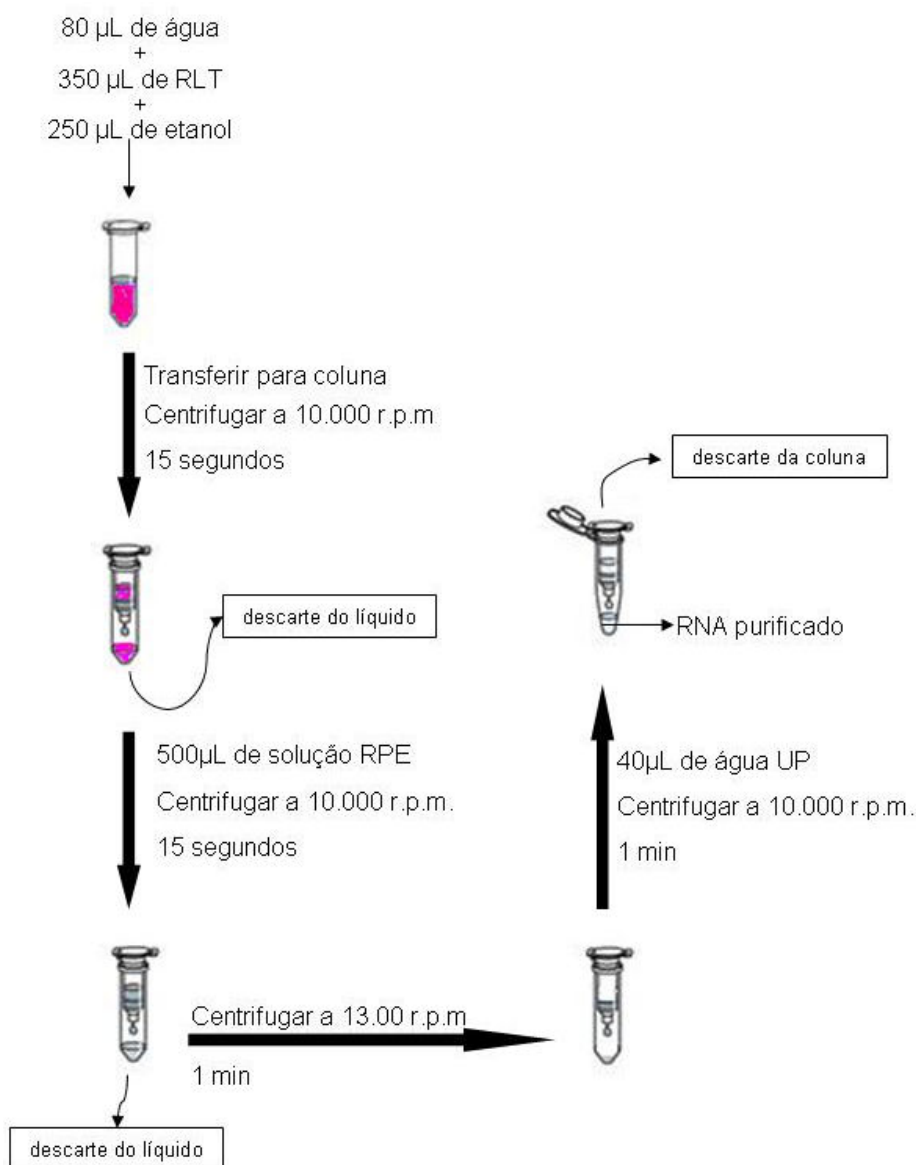


Figura 26 – Esquema do procedimento de purificação do DNA contido no gel de agarose.

5.8 Fragmentação do RNA

A etapa de fragmentação permite uma quebra química arbitrária das fitas de RNA. Esta etapa é importante porque os microchips filogenéticos utilizados no Laboratório Ampère são compostos de 15.000 sondas de oligonucleotídeos com 20 pares de base. Assim, os fragmentos de RNA marcados com Cy3, que têm cerca de 1500 nucleotídeos, devem ser quebrados em fragmentos menores, para que a ligação com as sondas ocorra mais facilmente.

Assim como ocorre para as etapas de PCR e transcrição, o primeiro passo consiste na preparação de uma mistura, como indicado na Tabela 11. Em seguida, adiciona-se 5,71 µL dessa solução em cada tubo contendo RNA marcado com Cy3.

Tabela 11 – Mix de fragmentação química.

Reagente	VOLUME UTILIZADO POR REAÇÃO (μL)
Tris Cl (1mM)	1,14
ZnSO ₄ (100mM)	4,57
VOLUME final	5,71

Realiza-se uma incubação a 60°C por 30 minutos, após a qual, para se parar a reação de quebra, coloca-se os tubos no gelo e adiciona-se 1,15 mL de uma solução de EDTA 500mM.

O EDTA é um reagente que atrai íons bivalentes tais como o Zn²⁺, o que permite interromper a reação de fragmentação. Se a reação não é interrompida a tempo, os fragmentos de RNA marcados serão muito curtos e não terão um bom posicionamento durante a hibridização, que se tornará menos específica e terá falso-positivos.

Após 1 minuto adiciona-se 1μL de RNasin 40U/μL, a fim de se inibir as enzimas RNases suscetíveis de estarem ainda presentes no meio. A amostra estará então pronta para a etapa de hibridização.

A Figura 27 ilustra esquematicamente a etapa de fragmentação do RNA.

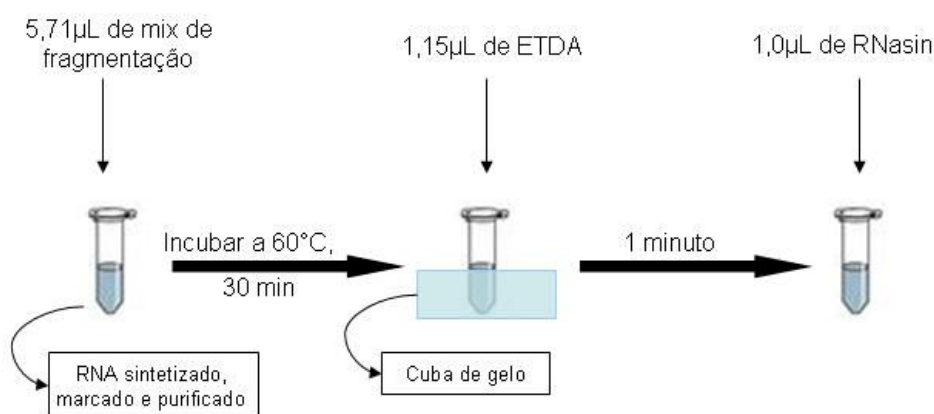


Figura 27 – Esquema da etapa de fragmentação do RNA.

5.9 Hibridização

O princípio dos microchips de DNA é baseado na hibridização por complementaridade de duas fitas de ácidos nucleicos, sendo que uma dessas fitas, chamada de sonda, está imobilizada sobre um suporte sólido. As sondas são específicas de diferentes seqüências representativas de uma família, grupo ou gênero

de bactérias e permitem detectar uma sequência-alvo marcada dentro de uma solução estudada.

Os microchips utilizados no Laboratório Ampère são fabricados pela empresa americana Agilent Technologies. Constituem-se em lâminas de vidro compostas por 8 blocos de sondas, cada um contendo cerca de 3.000 sondas diferentes, repetidas de 3 a 5 vezes, o que totaliza 15.000 sondas em cada bloco. Cada sonda é constituída de uma curta sequência de 20 nucleotídeos.

O design e escolha das sondas foram feitos por especialistas da Equipe de Microsistemas e Microbiologia do Laboratório Ampère, de maneira a serem complementares a sequências de rRNA 16S que caracterizam famílias, gêneros ou espécies específicas.

Quando uma sequência de RNA marcada com Cy3 é complementar a uma sonda fixada na lâmina, ocorre a hibridização específica por intermédio de uma ligação fraca, do tipo ponte de hidrogênio. Essa hibridização poderá ser revelada através da análise da lâmina por um escâner de fluorescência, sendo constatada sob a forma de um *spot* cuja intensidade é função do número de moléculas hibridizadas.

Esta etapa é relativamente simples. O primeiro passo consiste na diluição das amostras de RNA com água ultra-pura para que todas as soluções de RNA contenham a mesma concentração de 40ng/μL.

Alcançada essa diluição, transfere-se 25μL da mesma para um tubo limpo de 1,5mL e acrescenta-se 25μL da solução de hibridização fornecida pelo fabricante dos microchips (2X GEx Hybridization Buffer HI-RPM da Agilent). Homogeneiza-se a amostra com o auxílio da pipeta, de maneira cuidadosa para evitar a formação de bolhas.

O tubo será então centrifugado a 13.00r.p.m. por 1 minuto e após isso deve-se proceder a deposição da solução nos microchips.

Para isso, utiliza-se uma lâmina de deposição (*gasket slide*) que consiste numa lâmina com 8 cavidades para a disposição de 8 amostras. Essa lâmina não contém as sondas e tem apenas a função de separar amostras uma das outras. Em seguida, acopla-se o microchip propriamente dito (que contém as sondas) sobre a lâmina de deposição, formando um sanduíche, que será fixado com a câmara de hibridização (*hybridization chamber*).

Esse arranjo será disposto num forno de hibridização com temperatura de 60°C, onde será rotacionado a 20r.p.m. durante cerca de 20 horas.

A Figura 28 esquematiza a etapa de hibridização.

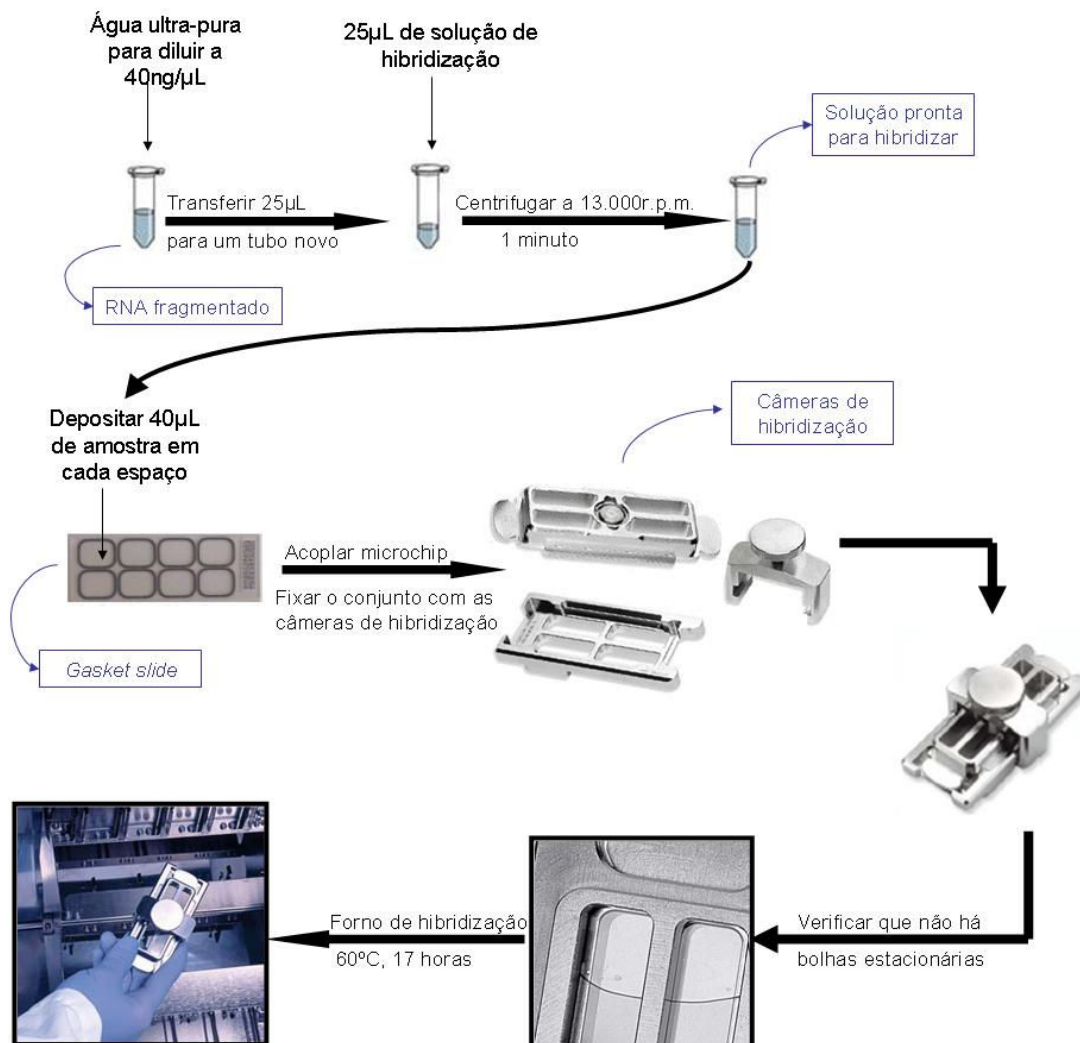


Figura 28 – Esquema da etapa de hibridização.

5.10 Lavagem

Após a hibridização deve-se proceder à lavagem do microchip para se eliminar os fragmentos de RNA não-hibridizados, assim como outros reagentes.

A etapa de lavagem começa pela preparação de todo o material, uma vez que a manipulação deve ser feita de forma ágil. Para a lavagem, utiliza-se duas soluções fornecidas pelo fabricante dos microchips: *wash buffer 1* e *wash buffer 2* (Agilent Technologies).

O material consiste em duas cubas de vidro repletas de *wash buffer 1*, sendo que em uma delas, acopla-se um suporte para lâmina e um agitador magnético. Além disso, será necessário um tubo plástico com tampa contendo o *wash buffer 2*.

O conjunto microchip + gasket é retirado do forno de hibridização e colocado numa bancada de trabalho plana. O conjunto é retirado das câmeras de hibridização, segurando-se o mesmo apenas nas bordas, e é rapidamente submergido na primeira cuba contendo *wash buffer 1*.

O sanduíche de microchip e gasket será separado (sempre submerso no *wash buffer* 1). Enquanto a gasket será deixada no fundo da primeira cuba, o microchip será transferido para a segunda cuba de *wash buffer* 1, sendo colocado no suporte. A agitação magnética é ligada durante 1 minuto. A Figura 29 ilustra essa etapa da lavagem.

Em seguida, o microchip é transferido para um tubo plástico contendo o *wash buffer* 2, onde ficará durante 1 minuto.

O microchip é retirado do tubo com o auxílio de uma pinça de maneira a que não fiquem gotas em sua superfície e assim se encerra a etapa de lavagem, estando o microchip pronto para a leitura no escâner.



Figura 29 – Primeira etapa de lavagem do microchip após hibridização.

5.11 Escaneamento do microchip

A imagem de hibridização é obtida através do escaneamento da lâmina, efetuado pelo escâner GenePix Personal 4100A. A Tabela 12 traz as especificações técnicas desse equipamento e a Figura 30 ilustra o mesmo.

Tabela 12 – Especificações técnicas do escâner GenePix Personal 4100A.

Equipamento	GenePix Personal 4100A
Tipo de amostra	Lâminas de microscópio padrão (25 mm x 75 mm)
Área máxima de escaneamento	22 mm x 71.5 mm
Excitação	532 nm e 635 nm
Resolução do pixel	Ajustável de 5 a 100 μm
Resolução digital	16 bits



Figura 30 – Escâner GenePix Personal 4100A.

A lâmina deve ser colocada no escâner conforme indicação do fabricante. A leitura é feita no comprimento de onda de 532 nm (comprimento de onda de emissão do marcador Cy3) e com a resolução máxima de 5 microns. Cada linha da imagem é escaneada duas vezes e a intensidade do sinal será a média dos dois valores.

Os escâners a laser utilizam um fotomultiplicador (*photo-multiplier tube*, PMT) como sistema de detecção e amplificação de radiação. O PMT consiste em um plano ótico que permite detectar fótons e gera uma corrente elétrica que é proporcional ao número de fótons detectados. O PMT do escâner GenePix é usado para detectar os fótons que são emitidos dos fluoróforos do *microarray* quando excitados com o laser.

O fotomultiplicador é utilizado sempre que se pretender detectar e medir radiação pouco intensa. Um parâmetro importante que deve ser regulado é o *PMT gain*, que corresponde a sensibilidade do fotomultiplicador ao sinal emitido. Assim, quanto maior o *PMT gain*, maior a sensibilidade aos fótons emitidos. Nas análises realizadas no Laboratório Ampère, utilizou-se um *gain* de 500.

O tempo de escaneamento de uma lâmina é de cerca de 20 minutos

Após o escaneamento da lâmina, obtém-se a imagem de hibridização, que, no caso dos microchips filogenéticos usados no Laboratório Ampère, é constituída de oito blocos de pontos luminosos. A imagem será tratada com o auxílio do software GenePix Pro, que é fornecido juntamente com o escâner, e proporciona os primeiros passos para a análise dos resultados.

De posse da imagem, deve-se fazer o alinhamento dos *spots* com o auxílio de uma grade (*grid*). A grade é fornecida pelo fabricante dos microchips e atua como um mapa que indica qual sonda corresponde a cada *spot*. A grade é colocada sobre a imagem a fim de identificar cada *spot*, indicando suas coordenadas únicas e delimitando a superfície do *spot* em relação ao resto da lâmina.

Feito o alinhamento, o software fornecerá como resultado uma lista de todas as sondas presentes no microchip e a intensidade do sinal para cada uma. Assim, quando a intensidade do sinal é representativa, tem-se a indicação da presença da sequência da sonda na amostra ambiental, permitindo relacionar com a presença de uma família, gênero ou espécie.

O programa gera tabelas de dados com informações referentes à hibridização de cada *spot*. Cada sonda recebe um valor numérico de acordo com a sua respectiva intensidade na imagem.

Após a captação da imagem e a quantificação dos sinais obtidos para cada *spot*, é feita a subtração do valor referente à emissão de fundo (*background*), não específica, presente em toda lâmina. Essa subtração procura remover o nível de “ruído”, permitindo fazer a comparação entre os sinais específicos de cada *spot*. Entretanto, existem variações do nível de *background* ao longo da lâmina, podendo afetar mais alguns *spots* que outros. Dessa forma, a subtração do *background* local, ao redor de cada *spot* é a maneira mais confiável para a obtenção dos dados.

O programa GenePix Pro permite calcular o *background* local e já subtrai esse valor, gerando tabelas que contêm os valores locais de *background*, os valores brutos para cada *spot* e esses valores subtraídos do *background*, que serão os utilizados nas próximas etapas de normalização.

Deve-se realizar uma filtragem de valores negativos ou nulos e em seguida, os dados são normalizados dividindo-se a intensidade de sinal de cada ponto pela mediana do sinal de todos os pontos da lâmina.

5.12 Tratamento de dados e resultados

Os *microarrays* proporcionam uma enorme quantidade de dados. De acordo com Lucchini *et al.* (2001), isso pode ser uma vantagem e uma desvantagem ao mesmo tempo: o potencial da informação genômica em larga-escala é incrível, mas freqüentemente a análise dos resultados dos microchips limita-se à produção de catálogos de expressão ou repressão de genes particulares. Essa abordagem limitada falha na exploração do real valor das informações que podem ser fornecidas pelos microchips de DNA.

Para se obter resultados interessantes e confiáveis são necessárias avançadas ferramentas matemáticas e estatísticas. Para um *microarray* contendo 5000 sondas,

prevê-se a presença de 250 falso-positivos, de acordo com a distribuição Gaussiana dos dados. Assim, fica evidente a importância de replicatas e da avaliação de significância estatística. Atualmente, muitas ferramentas de bioinformática estão sendo desenvolvidas para serem aplicadas no tratamento dos dados provenientes de técnicas high-throughput.

O tratamento dos dados obtidos com os microarrays constitui-se na etapa mais desafiadora dos estudos, e, por enquanto, ainda não existe uma padronização de como se proceder a essa etapa.

No Laboratório Ampère o tratamento dos dados é um assunto bastante estudado e discutido. No momento, os resultados limitam-se a presença/ausência de um determinado grupo correspondente a uma determinada sonda, em função da intensidade do sinal da mesma. Assim, os resultados são prioritariamente semi-qualitativos e não quantitativos. Pode-se comparar comunidades bacterianas presentes em solos que receberam tratamentos diferentes, ou constatar a variação que ocorre num mesmo solo em tempos diferentes, o que ressalta os mecanismos de adaptação a mudanças ambientais.

O design do microchip apresenta algumas características que permitem uma validação dos resultados finais: num *microarray* estão presentes sondas representativas de famílias, gêneros e espécies.

Se a sonda específica de uma espécie se ilumina, é necessário que as sondas do gênero e da família que abrangem essa espécie se iluminem também. No entanto, o contrário não é verdadeiro. Pode ocorrer de a sonda de um gênero se iluminar, e nenhuma sonda de espécie desse gênero se iluminar. Nesse caso, deduz-se que a espécie presente na amostra não está representada no *microarray* (seja pela escolha das espécies que se desejou colocar no *array*, seja pelo fato de ser uma espécie desconhecida).

Outro ponto do design que serve para confirmar a eficiência do experimento é a presença de triplicatas ou quintuplicatas das sondas. Assim, uma mesma sonda é repetida 3 ou 5 vezes e deve-se verificar que a intensidade do sinal é aproximadamente a mesma nas replicatas.

Além de se extrair o máximo de informação possível do microchip, também é necessário poder-se comparar experimentos diretamente. No momento, isso ainda não pode ser feito, pois a intensidade dos sinais de hibridização entre microchips diferentes varia muito.

6. CONCLUSÕES

Os microchips filogenéticos demonstraram ser uma ferramenta molecular inovadora com enorme potencial para utilização nos estudos ambientais, sendo cada vez maior o número de artigos e pesquisas que propõem sua utilização. Sua aplicação nos estudos de biodiversidade do solo permite a rápida detecção das comunidades microbianas presentes, podendo se estabelecer uma relação entre o tipo e qualidade do solo com sua população bacteriana.

Entretanto, as aplicações dos microchips filogenéticos não se restringem a estudos de biodiversidade de solos, podendo também ser utilizados para a detecção de patógenos em amostras de água, definição de comunidades que possam ser indicadoras de qualidade ambiental, respostas adaptativas a toxicidade num determinado ambiente, diagnósticos de doenças, detecções de mutações, dentre inúmeras outras aplicações.

A pesquisa da metodologia empregada no Laboratório Ampère na utilização dos microchips filogenéticos revelou que o procedimento metodológico é relativamente simples, porém exige conhecimentos básicos de biologia molecular para que haja uma real compreensão do que acontece em cada etapa, e não seja simplesmente uma memorização de protocolos.

É importante prevenir a introdução de erros sistemáticos quando se trabalha com um grande número de variáveis, como é o caso dos microchips filogenéticos. Diversos fatores podem interferir em sua sensibilidade, reprodutibilidade e confiabilidade técnica, porém três se destacam: a quantidade e qualidade de DNA que se consegue extrair do solo, erros que podem ocorrer durante a PCR e as flutuações que ocorrem durante a marcação do RNA.

Assim, ressalta-se a importância de se realizar um pré-estudo de diversos métodos de extração de DNA, e uma vez escolhido um método, mantê-lo durante todo o período de estudo. A comparação de resultados de estudos diferentes deve levar em consideração a técnica de extração de DNA do solo, uma vez que dependendo da técnica, a eficiência na extração do DNA de comunidades específicas varia.

Apesar do poder e utilidade da PCR, alguns erros e incertezas associadas à técnica tem implicações negativas significantes na análise e interpretação de dados referentes a comunidades microbianas de amostras ambientais. As limitações da PCR em contextos ambientais estendem-se, portanto, aos métodos de detecção que utilizam seus produtos (caso dos microchips de DNA), independentemente da sensibilidade e especificidade do método. Assim, o desenvolvimento de técnicas para a detecção direta de ácidos nucleicos de amostras ambientais, sem necessidade de amplificação por PCR, é de grande valia para a utilização dos microchips de DNA, pois permite a descrição dos microrganismos *in situ* de maneira acurada e quantitativa. As técnicas de detecção direta estão sendo bastante pesquisadas no momento, e vários artigos encontram-se disponíveis, embora ainda não haja um consenso sobre os melhores meios de se realizar a detecção direta.

Já as flutuações durante a etapa de marcação do RNA são devidas ao fato de que o fluoróforo Cy3 está acoplado ao nucleotídeo Uracila (UTP-Cy3) e, portanto,

terá maior incorporação em seqüências de nucleotídeos ricas em bases A e U, e será pouco incorporado em seqüências ricas em C e G, causando uma diferença na fluorescência das seqüências, que poderá se refletir na análise dos resultados.

A definição dos oligonucleotídeos que comporão o *microarray* é uma etapa crucial para o sucesso dos estudos que utilizam os microchips filogenéticos. O design das sondas terá influência direta nos resultados obtidos e constitui-se numa tarefa exaustiva de pesquisa de seqüências genéticas em bancos de dados. O design é feito com o auxílio do software ARB e é posteriormente encaminhado a empresa que fabrica os microchips filogenéticos personalizados.

Embora os microchips filogenéticos proporcionem milhares de dados em um só experimento, ainda é necessário o aprimoramento das técnicas utilizadas nas análises desses dados. Atualmente, os resultados obtidos são essencialmente qualitativos. Entretanto, com o desenvolvimento de métodos de normalização do sinal será possível fazer comparações entre comunidades bacterianas de ambientes diferentes em termos de maior ou menor presença de cada grupo.

7. RECOMENDAÇÕES

O estudo dos procedimentos metodológicos utilizados nas aplicações dos microchips filogenéticos não se esgota de maneira nenhuma com esse trabalho, pois a metodologia deve ser constantemente aprimorada a fim de se obter resultados cada vez mais confiáveis. Assim, os tópicos a seguir trazem sugestões para futuros estudos nesse tema.

✓ **Avaliação de diferentes métodos para a extração do DNA de amostras ambientais.** Essa etapa tem importância crucial para o desenvolvimento e resultados dos estudos que utilizam os microchips filogenéticos, uma vez que a técnica de extração influencia na quantidade e qualidade do material genético. Além disso, deve-se procurar uma técnica que possibilite a extração do DNA de todas as comunidades bacterianas presentes na amostra ambiental, para que os resultados obtidos sejam representativos.

✓ **Investigação de outros *primers* para a amplificação via PCR.** Os *primers* utilizados atualmente (pA e pH) não são eficientes na amplificação da região do gene 16S em bactérias *Archaea*. Sugere-se, portanto, que estudos que tenham interesse nesse grupo de bactérias utilizem outro conjunto de *primers*. Caso se queira avaliar tanto a presença de *Eubacteria* quanto de *Archaea*, pode-se estudar a realização de duas PCRs com *primers* diferentes.

✓ **Comparação entre diferentes métodos de marcação das seqüências-alvo.** Atualmente faz-se a marcação do RNA da amostra durante a etapa de transcrição. No entanto, outros métodos podem ser pesquisados e a literatura tem explorado técnicas para a marcação durante a etapa de amplificação por PCR.

✓ **Aplicação de tratamento com DNases aos produtos da transcrição.** Após a transcrição, o RNA é purificado para que ocorra a eliminação de reagentes não utilizados durante a reação. Nesse momento pode ser interessante o emprego de um tratamento com DNases (enzimas que degradam o DNA), para garantir que os resultados de hibridização não sofrerão efeitos devido a presença de moléculas de DNA remanescentes.

✓ **Avaliação da real necessidade da fragmentação do RNA.** Sugere-se a realização de estudos comparativos dos resultados de hibridização com RNA fragmentado e não-fragmentado. Caso não haja necessidade de fragmentação do RNA, o método para a marcação da molécula pode ser mudado: ao invés da incorporação de nucleotídeos acoplados com Cy3, pode-se utilizar a marcação na extremidade das moléculas de RNA (o que não pode ser feito quando o RNA será fragmentado). Nesse caso, elimina-se o problema de diferença de incorporação de fluorescência, que varia conforme a predominância de bases nitrogenadas específicas (seqüências que contêm grande quantidade de citosina e guanina apresentam menor marcação).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H. *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation*. Microbiological Reviews, vol. 59, p.143–169, 1995.
- AMPÈRE. *Laboratoire Ampère*. Unidade Mista de Pesquisa do Centro Nacional de Pesquisa Científica n.5005. Site oficial: < <http://www.ampere-lab.fr> >. Acessado em 20 de agosto de 2007.
- BELLO, J. L. DE P. *Instrumentos de coleta de dados*. In: Pedagogia em Foco, Metodologia Científica. Rio de Janeiro: 2004. Acesso em: 28 de outubro de 2007. Disponível em <<http://www.pedagogiaemfoco.pro.br/met06.htm>>
- BOIVIN-MASSON, C.; BONTEMPS, C.; GOLFIER, G.; GRIS-LIEBE, C.; TALINI, L. *Détection et typage du gène à l'aide de biopuces à ADN : perspectives pour l'étude de la diversité et de l'écologie moléculaire des rhizobia*. Bureau de Ressources Génétiques, França, 2006.
- BORNEMAN, J.; SKROCH, P.; O'SULLIVAN, K.; PALUS, J.; RUMJANEK, N.; JANSEN, J.; NIENHUIS, J.; TRIPLETT, E. *Molecular Microbial Diversity of an Agricultural Soil in Wisconsin*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.62, n.6, p. 1935–1943, 1996.
- CALL, D.R.; BORUCKI, M.K.; LOGE, F.J. *Detection of bacterial pathogens in environmental samples using DNA microarrays*. Journal of Microbiological Methods, v. 53, p. 235– 243, 2003.
- CANADÁ. Instituto de Pesquisa em Biotecnologia: Conselho Nacional de Pesquisas do Canadá. Disponível em < www.irb-bri.cnrc-nrc.gc.ca >2006. Acessado em 16 de outubro de 2007.
- DEMO, P. *Pesquisa: princípio científico e educativo*, 10.ed. – São Paulo: Cortez, 2003, 120p.
- FONSECA, M.C. *O valor da genómica em Microbiologia*. Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Portugal, 2005.

- GENOMENVIRON. *Environmental Microbial Genomics Group*. Laboratoire Ampère, École Centrale de Lyon. Site oficial: <<http://www.genomenviron.org>>. Acessado em 20 de agosto de 2007.
- GILBRIDE, K.A.; LEE, D.Y.; BEAUDETTE, L.A. - *Molecular techniques in wastewater: understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control*. Journal of Microbial Methods v.66, p.1-20, 2006.
- GOMES, C. M. da A. *A Biologia Molecular e os Procariontes*. Acção de Formação "Biologia Molecular e a Humanidade" do Projecto "TRENDS": 1998. Disponível em: <<http://www.co.it.pt/~emanuel/celia/bacteria.htm>>. Acessado em 28 de outubro de 2007.
- GUSCHIN, D. Y., MOBARRY, B. K.; PROUDINIKOV, D.; STAHL, D. A.; RITTMANN, B.; IZARBKOV, A. D. *Oligonucleotide microchips as genosensors for determinative and environmental studies in microbiology*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.63, n.6, p. 2397-2402, 1997.
- JANSSEN, B. *Microarrays: The high-tech machinery*. In: Biotechnology Learning Hub, portal eletrônico do governo da Nova Zelândia. 2007. Disponível em: <<http://www.biotechlearn.org.nz>>. Acessado em 22 de outubro de 2007.
- KUSKE, C. R. ; BARNS, S. M.; BUSCH, J. D. *Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many Geographic regions*. Applied and Environmental Microbiology. Washington, v.63, n.9, p. 3614–3621, 1997.
- LANE, D. L.; PACE, B.; OLSEN, G. J. STAHL, D. A.; SOGIN, M. L.; PACE, N. R. *Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses*. Proceedings of the National Academy of Sciences. Washington, v. 82, p. 6955-6959, 1985.
- LEE, D.Y.; SHANNON, K.; BEAUDETTE, L.A. *Detection of bacterial pathogens in municipal wastewater using an oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR*. Journal of Microbiological Methods, v. 65, p. 453–467, 2006.
- LÓPEZ, F. Siller. *Toxicogenómica: La nueva era de la toxicología*. In: anais do Tercero Congreso Ingeniería Química y Ambiental. Campus ITESO, Tiaquepaque, México, abril de 2004.

- LUCCHINI, S.; THOMPSON, A.; HINTON, J.C.D. *Microarrays for microbiologists*. Microbiology, n. 147, p. 1403-1414, 2001.
- LUCIANO, D. O. *Métodos Moleculares para Análise do DNA*. Monografia apresentada como requisito da disciplina de Estágio Supervisionado do Curso de Ciências Biológicas. Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos. São João da Boa Vista, 2004.
- MACRAE, A. *The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology*. Brazilian Journal of Microbiology. São Paulo, v.31, p. 77-82, 2000.
- MARSH, T. L.; SAXMAN, P.; COLE, J.; TIEDE, J. *Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research toll for microbial community analysis*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.66, n.8, p. 3616–3620, 2000.
- NOGALES B. *La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg*. 2005. Ecosistemas – Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente. 2005/2. Disponível em <www.revistaecosistemas.net/pdfs/116.pdf>. Acessado em 29 de agosto de 2007.
- NOVA ZELÂNDIA. *Biotechnology Learning Hub: Bringing biotechnology and education together*. Disponível em <<http://www.biotechlearn.org.nz>>. Acessado em 24 de outubro de 2007.
- OGRAM, A. *Soil molecular microbial ecology at age 20: methodological challenges for the future*. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v.32, p. 1499-1504, 2000.
- RABINOW, Paul. *Making PCR : a story of biotechnology*. Chicago University of Chicago Press, 1997. 190p ISBN 0226701476.
- REECE, R. J. *Analysis of Genes and Genomes*. University of Manchester, UK. 2003, 469p.
- REIS JUNIOR, F. B. [et al.]. *Uso de Ferramentas Moleculares em Estudos da Diversidade de Microrganismos do Solo*. Planaltina – DF: Embrapa Cerrados, 2002. 33p. ISSN 1517-5111

- RONDOM, M [et al.]. *Clonning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.66, n.6, p.2541-2547, 2000.
- SANGUIN, H.; HERRERA, A.; OGER-DESFEUX, C.; DECHESNE, A.; SIMONET, P.; NAVARRO, E.; VOGEL, T. M., NESME, X. *Development and validation of a prototype 16S rRNA based taxonomic microarray for Alphaproteobacteria*. Environmental Microbiology, v.8, p. 289-307, 2005.
- SANGUIN, H.; REMENANT, B.; DECHESNE, A.; THIOULOUSE, J. ; VOGEL, T. M.; NESME, X.; CRUNDMANN, G. *Potential of a 16S rRNA-Based Taxonomic Microarray for Analyzing the Effects of the Maize Rhizosphere on Agrobacterium spp. and Bacterial Communities*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.72, n.6, 2006.
- SEBAT, J. L.; COLWELL, F. S.; CRAWFORD, R. L. *Metagenomic profiling: microarray analysis of an environmental genomic library*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.68, n.8, p.4927-4934, 2003.
- SILVEIRA, E. L. da. *Identificação de Comunidades Bacterianas de Solo por Sequenciamento do Gene 16S rRNA*. Dissertação de Mestrado, UNESP Jaboticabal, 2004.
- SMALL, J.; CALL, D.R.; BROCKMAN, F.J.; STRAUB, T.M.; CHANDLER, D.P. *Direct detection of 16S rRNA in soil extracts by using oligonucleotide microarrays*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 67, p. 4708– 4716, 2001.
- STRAUB, T.M.; CHANDLER, D.P. *Towards a unified system for detecting waterborne pathogens*. Journal of Microbiological Methods, v. 53, p. 185-197, 2003.
- TEBBE, C. C.; VANJEN, W. *Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and yeast*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.59, n.8, p.2657-2665, 1993.
- THOMAS, A. ; CLOSSET, R.; BUREAU, F.; LEKEUX, P. *Principes des microdamiers à ADN et applications potentielles en sciences vétérinaires*. Annuaire Médical Vétérinaire, n. 149, p. 93-116, 2005.

- THOMPSON, F. L.; OLIVEIRA, V. M. de. *Taxonomia de procariotos*. Coleção Brasileira de Microorganismos de Ambiente e Indústria, CBMAI/UNICAMP, 2006.
- TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAEE, F. L. *High diversity in DNA of soil bacteria*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.56, n.3, p.782-787, 1990.
- WEINER, J.; ZIMMERMAN, C.U.; GOÉHLMANN, W.H.; HERRMANN, R. *Transcription profiles of the bacterium Mycoplasma pneumoniae grown at different temperatures*. Nucleic Acids Research, v. 31, n. 21, 2003.
- WOESE, C. *Bacterial Evolution*. Microbiol. Rev. 51, p. 221-271, 1987. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=373105>
- YERSHOV, G.; BARSKY, V.; BELGOVSKIY, A.; KIRILLOV, E.; KREINDLIN, E.; IVANOV, I.; PARINOV, S.; GUSCHIN, D.; DROBISHEV, A.; DUBILEY, S.; MIRZABEKOV, A. *DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips*. Proceedings of the National Academy of Sciences, Washington, v.93, p. 4913-4918, 1996.
- ZAHA, Arnaldo. *Biologia Molecular Básica*. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996. 336p. ISBN 8528002837.

ANEXOS

ANEXO I – Protocolo de extração do DNA do solo.

Protocol - UltraClean Soil DNA Isolation Kit

Please wear gloves at all times

1. To the 2ml Bead Solution tubes provided, add 0.25 - 1gm of soil sample. (For larger sample sizes up to 10 grams, try using our Mega Prep Kit, catalog number 12900-10).
2. Gently vortex to mix.
3. **Check Solution S1.** If Solution S1 is precipitated, heat solution to 60°C until dissolved before use.
4. Add 60µl of Solution S1 and invert several times or vortex briefly.
5. Add 200µl of Solution IRS (Inhibitor Removal Solution). Only required if DNA is to be used for PCR.
6. Secure bead tubes horizontally using the Mo Bio Vortex Adapter tube holder for the vortex (cat.13000-V1. Call 1-800-606-6246 for information) or secure tubes horizontally on a flat-bed vortex pad with tape. Vortex at maximum speed for 10 minutes. (See alternative lysis method for less DNA shearing).
7. Make sure the 2ml tubes rotate freely in your centrifuge without rubbing. Centrifuge tubes at 10,000 x g for 30 seconds. **CAUTION:** Be sure not to exceed 10,000 x g or tubes may break.
8. Transfer the supernatant to a clean microcentrifuge tube (provided).
9. **Note:** With 0.25gm of soil and depending upon soil type, expect between 400 to 450µl of supernatant. Supernatant may still contain some soil particles.
10. Add 250µl of Solution S2 and vortex for 5 sec. Incubate 4°C for 5 min.
11. Centrifuge the tubes for 1 minute at 10,000 x g.
12. Avoiding the pellet, transfer 450µl of supernatant to a clean microcentrifuge tube (provided).
13. Add 900µl of Solution S3 to the supernatant and vortex for 5 seconds.
14. Load approximately 700µl onto a spin filter and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute. Discard the flow through and add the remaining supernatant to the spin filter and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute. **Note:** A total of two loads for each sample processed are required.
15. Add 300µl of Solution S4 and centrifuge for 30 seconds at 10,000 x g.
16. Discard the flow through.
17. Centrifuge again for 1 minute.
18. Carefully place spin filter in a new clean tube (provided). Avoid splashing any Solution S4 onto the spin filter.
19. Add 50µl of Solution S5 to the center of the white filter membrane.
20. Centrifuge for 30 seconds.
21. Discard the spin filter. DNA in the tube is now application ready. No further steps are required.

We recommend storing DNA frozen (-20°C). Solution S5 contains no EDTA.

NucleoSpin® Extract II Kits User Manual

Protocol for DNA Extraction from Agarose Gels

1. Excise DNA fragment

Take a clean scalpel to excise the DNA fragment from agarose gel. Excise gel slice containing the fragment carefully to minimize the gel volume. Determine the weight of the gel slice and transfer it to a clean tube.

2. Gel lysis

For each **100 mg** agarose gel add **200 µl buffer NT**.

For gels containing > 2% agarose, double the volume of buffer NT. The maximum amount of gel slice per NucleoSpin® Extract II column is 400 mg or 200 mg of a high percentage gel > 2%. In this case 2 loading steps are required (step 3).

Incubate sample at **50°C** until the gel slices are dissolved (**5-10 min**). Vortex the sample briefly every 2-3 min until the gel slices are dissolved **completely!**

3. Bind DNA

Place a NucleoSpin® Extract II column into a 2 ml collecting tube and load the sample.

Centrifuge for **1 min at 11,000 x g**. Discard flow-through and place the NucleoSpin® Extract II column back into the collecting tube.

4. Wash silica membrane

Add **600 µl buffer NT3**. Centrifuge for **1 min at 11,000 x g**. Discard flow-through and place the NucleoSpin® Extract II column back into the collecting tube.

5. Dry silica membrane

Centrifuge for **2 min at 11,000 x g** to remove **buffer NT3** quantitatively. Make sure the spin column doesn't come in contact with the flow-through while removing it from the centrifuge and the collecting tube.

Residual ethanol from buffer NT3 would inhibit subsequent reactions and has to be removed in this step. In addition to centrifugation, total removal can be achieved by incubation of NucleoSpin® Extract II columns for 2-5 min at 70°C prior to elution.

6. Elute DNA

Place the NucleoSpin® Extract II column into a **clean** 1.5 ml microcentrifuge tube. Add **15-50 µl elution buffer NE**, incubate at **room temperature** for **1 min** to increase the yield of eluted DNA. Centrifuge for **1 min at 11,000 x g**.

Yield of larger fragments (> 5-10 kb) can be increased by using prewarmed elution buffer (70°C): For elution, add prewarmed elution buffer and incubate at room temperature for 1 min before collecting eluate by centrifugation.

Protocol: RNA Cleanup

The RNeasy Mini Kit can be used to clean up RNA previously isolated by different methods or after enzymatic reactions, such as labeling or DNase digestion.

Determining the correct amount of starting material

A maximum of 100 µg RNA can be cleaned up in this protocol. This amount corresponds to the RNA binding capacity of the RNeasy spin column.

Important points before starting

- If using the RNeasy Kit for the first time, read “Important Notes” (page 18).
- If working with RNA for the first time, read Appendix A (page 63).
- Buffer RLT may form a precipitate upon storage. If necessary, redissolve by warming, and then place at room temperature (15–25°C).
- Buffer RLT contains a guanidine salt and is therefore not compatible with disinfecting reagents containing bleach. See page 8 for safety information.
- Perform all steps of the procedure at room temperature. During the procedure, work quickly.
- Perform all centrifugation steps at 20–25°C in a standard microcentrifuge. Ensure that the centrifuge does not cool below 20°C.

Things to do before starting

- Buffer RPE is supplied as a concentrate. Before using for the first time, add 4 volumes of ethanol (96–100%) as indicated on the bottle to obtain a working solution.
- If performing optional on-column DNase digestion, prepare DNase I stock solution as described in Appendix D (page 69).

Procedure

1. **Adjust the sample to a volume of 100 µl with RNase-free water. Add 350 µl Buffer RLT, and mix well.**
2. **Add 250 µl ethanol (96–100%) to the diluted RNA, and mix well by pipetting. Do not centrifuge. Proceed immediately to step 3.**
3. **Transfer the sample (700 µl) to an RNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube (supplied). Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at 8000 x g (10,000 rpm). Discard the flow-through.***

Reuse the collection tube in step 4.

Note: After centrifugation, carefully remove the RNeasy spin column from the collection tube so that the column does not contact the flow-through. Be sure to empty the collection tube completely.

Optional: If performing optional on-column DNase digestion (see “Eliminating genomic DNA contamination”, page 23), follow steps D1–D4 (page 69) after performing this step.

- 4. Add 500 µl Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at 8000 x g (10,000 rpm) to wash the spin column membrane. Discard the flow-through.**

Reuse the collection tube in step 5.

Note: Buffer RPE is supplied as a concentrate. Ensure that ethanol is added to Buffer RPE before use (see “Things to do before starting”).

- 5. Add 500 µl Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 2 min at 8000 x g (10,000 rpm) to wash the spin column membrane.**

The long centrifugation dries the spin column membrane, ensuring that no ethanol is carried over during RNA elution. Residual ethanol may interfere with downstream reactions.

Note: After centrifugation, carefully remove the RNeasy spin column from the collection tube so that the column does not contact the flow-through. Otherwise, carryover of ethanol will occur.

- 6. Optional: Place the RNeasy spin column in a new 2 ml collection tube (supplied), and discard the old collection tube with the flow-through. Close the lid gently, and centrifuge at full speed for 1 min.**

Perform this step to eliminate any possible carryover of Buffer RPE, or if residual flow-through remains on the outside of the RNeasy spin column after step 5.

- 7. Place the RNeasy spin column in a new 1.5 ml collection tube (supplied). Add 30–50 µl RNase-free water directly to the spin column membrane. Close the lid gently, and centrifuge for 1 min at 8000 x g (10,000 rpm) to elute the RNA.**

- 8. If the expected RNA yield is >30 µg, repeat step 7 using another 30–50 µl RNasefree water, or using the eluate from step 7 (if high RNA concentration is required). Reuse the collection tube from step 7.**

If using the eluate from step 7, the RNA yield will be 15–30% less than that obtained using a second volume of RNase-free water, but the final RNA concentration will be higher.